Aus dem hygienischen Institut der Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Dresden.
Direktor: Professor Dr. Klimmer.

Beitrag zur färberischen Unterscheidung des Tuberkelbacillus und einiger anderer säurefester Bacillen mit besonderer Berücksichtigung der Alkalifestigkeit.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde

der

durch die ordentlichen Professoren der Königl. Tierärztlichen Hochschule in Dresden verstärkten Medizinischen Fakultät

der

Universität Leipzig

vorgelegt von

Tierarzt **Paul Köhler**
aus Borna (Bez. Chemnitz).

Dresden 1910.
Buchdruckerei Hugo Schumann.

Aus dem hygienischen Institut der Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Dresden.
Direktor: Professor Dr. Klimmer.

Beitrag zur färberischen Unterscheidung des Tuberkelbacillus und einiger anderer säurefester Bacillen mit besonderer Berücksichtigung der Alkalifestigkeit.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde

der

durch die ordentlichen Professoren der Königl. Tierärztlichen Hochschule in Dresden verstärkten Medizinischen Fakultät

der

Universität Leipzig

vorgelegt von

Tierarzt **Paul Köhler**
aus Borna (Bez. Chemnitz).

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

Dresden 1910.
Buchdruckerei Hugo Schumann.

Gedruckt mit Genehmigung der durch die ordentlichen Professoren der Tierärztlichen Hochschule in Dresden verstärkten medizinischen Fakultät zu Leipzig.

Leipzig, 30. April 1910.

Referent: **Herr Professor Dr. Klimmer.**

Meinen lieben Eltern

gewidmet.

Inhaltsverzeichnis.

Einleitung, Allgemeines und Differentialfärbeverfahren . . . . 5—40
Eigene Untersuchungen . . . . . 40—56
Zusammenfassung . . . . . 56—59

Einleitung.

Durch die epochemachende Koch'sche Entdeckung des Erregers der Tuberkulose und dessen einfachen färberischen Darstellung glaubte man zunächst einen einfachen Weg zum sicheren Nachweis des Tuberkelbacillus gefunden zu haben. Man war anfangs der Meinung, daß das bekannte eigentümliche Verhalten des Tuberkelbacillus gegenüber den Farb- und Entfärbungsflüssigkeiten diesem allein zukomme. Schon bald aber mußte man sich überzeugen, daß es außer dem Tuberkelbacillus noch andere Bacillen gibt, welche mehr oder weniger die gleichen färberischen Eigenschaften wie der Tuberkelbacillus erkennen lassen.

So lernte man in dem Leprabacillus einen Mikroorganismus kennen, der sich dem Tuberkelbacillus tinktoriell in weitgehender Weise gleich verhält. Ferner sind von Alvarez und Tavel[2]) im Jahre 1885 im Smegma, von Laabs[57]) auch an anderen Stellen der Haut und natürlichen Körperöffnungen etc. sogenannte Smegmabacillen gefunden worden. Petri[81]) und L. Rabinowitsch[84]) wiesen in Milch und Butter, später auch im Sputum die Milch- bez. Butterbacillen nach. Andere säurefeste Bakterien fand A. Moeller[68]) in pflanzlichen und tierischen Substraten. Auf Gras, und speziell auf dem Timotheegras, fand er je einen säurefesten, voneinander verschiedenen Bacillus; den ersteren nannte er Grasbacillus II, den letzeren Timothee-Bacillus. Aus tierischen Darmentleerungen konnte er den Mistbacillus isolieren. P. Moeller[71]) fand in tuberkelähnlichen, knotenförmigen Organveränderungen bei Schwein und Rind den säurefesten Pseudoperlsuchtbacillus. Korn[53]) züchtete einen nach ihm benannten säurefesten

Bacillus aus der Freiburger Marktbutter, und er unterscheidet dabei zwei Stämme, Bacillus Korn I und Bacillus Korn II. Weiter berichtet Mironescu [67]) vom Vorkommen säurefester, tuberkelbacillenähnlicher Stäbchen in menschlichen Faeces. Beck [11]) beschreibt zwei säurefeste Bacillenstämme, von welchen der eine, Bacillus tuberculoides I, aus der Butter, der andere, Bacillus tuberculoides II, aus der Tonsille einer an Phthisis pulmonum gestorbenen Frau gezüchtet wurde. Marzinowski [65b]) entdeckte säurefeste Bakterien in den Krypten der Gaumenmandeln, De Simoni [89]) im Sekret von chronischen Mittelohrkatarrhen. Dietrich [23]) isolierte bei einer Frau mit einem Tumor im Abdomen, die zuweilen an Blutbrechen litt und bei der man Peritonealtuberkulose vermutete, aus dem Eiter, welcher mit dem Stuhl entleert wurde, zahlreiche säurefeste, den Tuberkelbacillen ähnliche Stäbchen. Die Sektion ergab keine Tuberkulose, sondern eine nach dem Darm durchgebrochene Ovarialcyste. Olschanetzky [78]) züchtete aus einem Leberabscess einer Wanderratte eine Stäbchenart von partieller Alkohol- und Säurefestigkeit. Karlinski [47]) konnte aus Nasenschleim einen säurefesten Bacillus isolieren. Herr [43]) fand säurefeste Bacillen in der Ackererde, und zwar in 10 von 13 daraufhin untersuchten Erdproben. Die jetzt folgenden säurefesten Bacillenstämme dürften wohl als identisch mit bereits erwähnten zu bezeichnen sein, so der Bacillus aus Milch Moeller, der Bacillus aus Smegma Moeller [70]), der Bacillus aus Harn Marpmann, ferner die von Graßberger und Binot (Bacillus paratuberculosis) aus der Butter gezüchteten säurefesten Bacillen. Hormann und Morgenroth [45]) fanden ebenfalls bei der Untersuchung von 10 Butterproben einmal säurefeste Bacillen, ohne daß Tuberkulose vorlag, und dürften diese Bacillen ihrem kulturellen und sonstigen Verhalten nach mit den von L. Rabinowitsch beschriebenen identisch sein. Auch Weber [93]), der sich mit

der Verbreitung der tuberkelbacillenähnlichen, säurefesten Bakterien und ihrer differentialdiagnostischen Bedeutung beschäftigte, berichtet, daß es ihm gelungen ist, aus Marktbutter ein säurefestes Bakterium zu kultivieren, das er mit dem von Hormann und Morgenroth gezüchteten für identisch hält. Schließlich seien noch die fünf von Tobler[91]) isolierten und die von Weber und Tante[94]) im Moos von Froschbehältern gefundenen säurefesten Bakterienstämme erwähnt.

Im Anschluß an diese sämtlichen genannten, tuberkelbacillenähnlichen Stäbchen möchte ich noch, als in die Gruppe der Säurefesten gehörig, die Kaltblütertuberkelbacillen erwähnen, und zwar zunächst den Fischtuberkelbacillus, von Bataillon, Dubard und Terre[8]) im Jahre 1897 entdeckt, ferner den von Moeller[69]) gefundenen Blindschleichentuberkelbacillus, weiter den Schildkrötentuberkelbacillus, von Friedmann[34]) entdeckt, schließlich den Froschtuberkelbacillus, den Rupprecht[84]) und Küster[56]) bei Fröschen gefunden haben.

Alle diese säurefesten Bacillen verhalten sich, wenn man sie den üblichen Färbeverfahren des Tuberkelbacillus unterwirft, mehr oder weniger dem letzteren gleich, so daß bei ihrer weitgehenden gestaltlichen Uebereinstimmung eine hinlänglich sichere Unterscheidung derselben von dem Tuberkelbacillus bei der mikroskopischen Untersuchung sehr schwer, vielfach unmöglich ist. Dieser Uebelstand, der schon oft zu verhängnisvollen Irrungen geführt hat, gab die Veranlassung, die zur färberischen Unterscheidung des Tuberkelbacillus von den sonstigen säurefesten Bacillen empfohlenen, besonderen Verfahren nachzuprüfen, wobei auf die in letzter Zeit von Gasis[35]) angegebene Unterscheidung auf Grund der Alkalifestigkeit besonders Rücksicht genommen wurde.

Bevor ich auf meine eigenen, diesbezüglichen Untersuchungen eingehe, sei es mir gestattet, einen Ueberblick

über die zur färberischen Unterscheidung des Tuberkelbacillus von den anderen säurefesten Bacillen angegebenen Verfahren zu geben, nachdem ich vorher im allgemeinen die tinktoriellen und morphologischen Eigenschaften des Menschen-, Säugetier- und Vogeltuberkelbacillus einerseits und der hauptsächlichsten der erwähnten säurefesten Saphrophyten andererseits besprochen habe.

Die **Tuberkelbacillen** sind säure- und alkoholfest und nehmen, gleich ob sie virulent, avirulent oder abgetötet sind, ob sie jung oder alt sind, die Farbe, wenn auch schwer, auf und geben die einmal aufgenommene Farbe auch schwer wieder ab. Doch färben sich scheinbar abgetötete Turberkelbacillen intensiver als virulente, und junge Bacillen färben und entfärben sich nach Marmorek[64]) leichter als ältere. Klein[51]) hat nachgewiesen, daß ganz junge Tuberkelbacillen zunächst noch nicht säurefest sind. Die Tuberkelbacillen entfärben sich im Gegensatz zu den anderen säurefesten Bakterien untereinander mehr gleichmäßig; der einzelne Bacillus ist aber oft nicht gleichmäßig von der Farblösung durchtränkt, sondern zeigt eine mehr granuläre Form, indem einzelne Stellen des Bakterienleibes sich als intensiver gefärbte, dunkle Körnchen von dem übrigen Protoplasma abheben. So kommt es, daß die Tuberkelbacillen im Gegensatz zu den anderen säurefesten Stäbchen oft ein perlschnurartiges Aussehen besitzen. Man kann auch, was ebenfalls die anderen säurefesten Bacillen vermissen lassen, oft eine zopfartige Anordnung der Tuberkelbacillen im mikroskopischen Bilde wahrnehmen. Im allgemeinen kann man sagen, daß die Tuberkelbacillen sich schwerer färben, aber auch entfärben lassen als die anderen säurefesten Bakterien; doch sollen auch hierbei nach Angabe vieler Autoren die größten Abweichungen von der Regel vorkommen. Was die Unterschiede der Menschen-, Säugetier- und Vogeltuberkelbacillen unter sich anlangt, so dürften nach den heute herrschenden

Anschauungen konstante durchgreifende morphologische und tinktorielle Verschiedenheiten zwischen dem Bacillus tuberculosis hominis und dem der Säugetiere nicht vorhanden sein. Man faßt sie vielmehr nach den Umwandlungsversuchen von Dammann und Müssemeier [21]), de Jong [46]), Eber [26]), Arloing [5]), Karlinski [48]) etc. als eine gemeinsame Spezies auf, die allerdings gegebenenfalls gewisse, wenn auch nicht hinlänglich konstante Standartseigentümlichkeiten, die zu einer Trennung in den Typus humanus und bovinus geführt haben, aufweisen können. Ebenso halten Nocard [77]), Fischel [28]) und Bang [7]) auf Grund ihrer Tierversuche den Menschen- und Säugetiertuberkelbacillus für identisch mit dem Bacillus tuberculosis avis und betrachten den letzteren ebenfalls nur als Standartsvarietät. Tinktoriell verhalten sich diese Bacillen auch nahezu gleich; der Vogeltuberkelbacillus färbt und entfärbt sich jedoch in der Regel etwas schneller.

Was nun die säurefesten tuberkelbacillenähnlichen Bakterien anlangt, so ist in dieser Gruppe außer dem Leprabacillus am längsten der **Smegmabacillus** bekannt. Entdeckt wurde er, wie erwähnt, von Alvarez und Tavel [2]) und zuerst beschrieben von diesen und Matterstock [66]). Diese Bacillen stellen schlanke, oft etwas gekrümmte, aber scharf konturierte Stäbchen dar. Eine Verwechslung der Smegmabacillen mit Tuberkelbacillen ist bei der Untersuchung von Urin auf Tuberkelbacillen öfters vorgekommen. Aber nicht nur bei der Untersuchung von Material aus dem Harn- und Geschlechtsapparat kommen diese Bacillen in Betracht, sondern Laabs [57]) fand sie auch an den verschiedensten Stellen der Hautoberfläche, vor allem an den natürlichen Körperöffnungen, hauptsächlich da, wo sich Hautsekret ansammelt, oft sogar im Zungen- und Zahnbelag. Wie praktisch wichtig es aber ist, eine genaue Unterscheidung zwischen dem Kochschen Bacillus und dem Smegmabacillus treffen

zu können, mögen folgende klinische, leider nicht vereinzelt dastehende Beobachtungen illustrieren. Laabs berichtet von einem Fall, wo bei Untersuchung des Urins die vorhandenen Smegmabacillen für Tuberkelbacillen gehalten wurden und infolgedessen Nierentuberkulose diagnosticiert wurde. Die Operation aber, die zwecks Extirpation der tuberkulös befundenen Niere vorgenommen wurde, bestätigte die Diagnose nicht, sondern ließ einen Absceß in der Lendengegend erkennen. Ferner fand A. Fränkel[31]) bei Patienten, die an Lungengangrän litten, im Sputum säurefeste Bakterien, die er zur Gruppe der Smegmabacillen rechnet. Ebenso konnte Pappenheim[79]) bei der Sektion eines Patienten, der auf Grund der Sputum-Untersuchung als Phthisiker gegolten hatte, nachweisen, daß es sich ebenfalls um Smegmabacillen gehandelt hatte.

Diese immer wieder vorkommenden Verwechslungen lassen sich bei den Harnuntersuchungen, wie das auch Grünbaum[39]) bestätigt, bekanntlich mit weitgehender Sicherheit durch eine möglichst aseptische Abnahme des zu untersuchenden Harnes vermeiden. Dagegen ist eine rein morphologische Unterscheidung beider Bacillenarten nicht hinlänglich möglich. Die häufig unterbrochene, perlschnurartige Färbung des Tuberkelbacillus dürfte zu seiner Unterscheidung von dem die Farbe gleichmäßig aufnehmenden Smegmabacillus wohl vielfach versagen, so daß für den sicheren mikroskopischen Nachweis des Tuberkelbacillus neben dem Smegmabacillus nur die Differentialfärbung in Frage kommen kann. Auf den Kultur- und Tierversuch, die bekanntlich bei der Differentialdiagnose des Tuberkelbacillus und der anderen säurefesten Bacillen sehr wertvolle Dienste leisten, soll hier, da sie außerhalb meines Untersuchungsgebietes liegen, nicht eingegangen werden. Auf die Differentialfärbemethoden komme ich später zu sprechen. Im allgemeinen sei hier nur erwähnt, daß sich der Smegmabacillus vom

Tuberkelbacillus dadurch unterscheidet, daß er sich gewöhnlich leichter färben und entfärben läßt. Vor allem vertragen nach G. Klemperer[52]) die Tuberkelbacillen die Säure viel länger als die Smegmabacillen, denn während sich die letzteren bei Anwendung von 33 prozentiger Salpetersäure nach ca. 1½ Minute vollkommen entfärben, sollen die Tuberkelbacillen nach dieser Zeit noch gut gefärbt bleiben. Läßt man ferner bei einer Salpetersäure-Wirkung von 90 Sekunden nur einen einzigen Tropfen Alkohol unter das Deckglas treten, so sollen die gefärbten Smegmabacillen verschwinden, während die Tuberkelbacillen auch den Alkohol sehr gut vertragen.

Es gibt aber auch unter den Smegmabacillen Arten bez. einzelne Stäbchen, die ebenso resistent, oft sogar noch resistenter sind gegen Alkohol und Säuren als die Tuberkelbacillen. Nach Tavel[90]) vertragen die Smegmabacillen den Alkohol weniger gut als die Tuberkelbacillen; die Säure vertragen sie mitunter ebenso gut. Nencki und Podczasky[75]) betonen, daß der Smegmabacillus zwar säurefest, aber gegen Alkohol wenig resistent ist; es sei daher möglich, die Smegmabacillen in Präparaten, welche mit Säure behandelt und mit Alkohol entfärbt wurden, von den Tuberkelbacillen zu unterscheiden. Von den später zu besprechenden Möller'schen Bacillen soll sich der Smegmabacillus durch die geringere Resistenz gegen Alkohol unterscheiden. Forsell[30]), der zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Harn ein besonderes Verfahren empfiehlt, hält Verwechslungen mit Smegmabacillen, die wahrscheinlich auch mit den von Lustgarten[62]) in syphilitischen Krankheitsprodukten gefundenen und für den Erreger der Syphilis gehaltenen Bacillen identisch sind, insofern für ausgeschlossen, als letztere im Gegensatz zu den Tuberkelbacillen nach Behandlung mit Carbolfuchsin und Salpetersäure durch 50 prozentigen Acetonalkohol in drei Minuten entfärbt werden.

Bitter[15]) macht bezüglich der Differentialdiagnose zwischen Smegma- und Tuberkelbacillen auf folgende Punkte aufmerksam: Die Unterscheidung genannter Bacillenarten kommt fast nur für Urinuntersuchungen in Betracht, während bei Untersuchungen von Sputum und Gewebsschnitten Smegmabacillen kaum in Betracht kommen. Die gefärbten Smegmabacillen würden aber nach vorheriger Säurewirkung durch absoluten Alkohol sehr rasch entfärbt, hingegen verhielten sich die Tuberkelbacillen diesen Flüssigkeiten gegenüber sehr resistent. Indessen fand Bitter bei seinen Untersuchungen, daß mitunter die Smegmabacillen gegen Säuren besonders sehr widerstandsfähig waren; es sei also die Resistenz gegen Säuren und Alkohol bei Smegma- und Tuberkelbacillen keine eng begrenzte. Das tinktoriell-ähnliche Verhalten aber beider Bakterienarten beruhe auf verschiedenen Ursachen; bei den Tuberkelbacillen liege dieses in den Bacillen selbst, bei den Smegmabacillen im umgebenden Medium.

Im Anschluß hieran möchte ich noch erwähnen, daß Neufeld[76]) gleich Czaplewsky[20b]) und Laser[58]) aus dem Smegma zwei voneinander verschiedene Stämme rein zu züchten vermochte, eine diphteriebacillenähnliche und eine tuberkelbacillenähnliche säurefeste Bakterienart, und er konstatiert, daß der diphteroide Stamm weniger säureresistent ist, daß sich daher beide Arten nicht miteinander identifizieren lassen. Nach C. Fränkel[33]) ist nur die tuberkuloide Form als echter Smegmabacillus anzusprechen.

Weitere säurefeste Bakterien wurden, wie bereits erwähnt, von Petri und L. Rabinowitsch in Milch und Butter gefunden und daraus zuerst in Reinkulturen gezüchtet. Veranlaßt zu diesen Untersuchungen wurden die genannten Forscher durch den bis dahin angeblich so häufigen Nachweis von Tuberkelbacillen in Milch und Butter. Petri[80]) fand die **Butterbacillen** in 52,9 Prozent, Rabinowitsch[84]) in 28,7 Prozent der untersuchten Butterproben. Die von ihnen

gefundenen säurefesten Stäbchen waren morphologisch kaum von dem Tuberkelbacillus zu unterscheiden, hingegen durch Kultur und Pathogenität. L. Rabinowitsch [84b]), berichtet ferner daß in einem Falle von Lungengangrän im Sputum säurefeste Bakterien nachgewiesen worden sind, die sie für identisch mit den von ihr entdeckten **Milchbacillen** hält. Vom Smegma- und dem später zu besprechenden Leprabacillus sollen sich die Milch- und Butterbacillen durch die größere Resistenz gegen Säuren und Alkohol unterscheiden. Verwechslungen der Milch- und Butterbacillen mit Tuberkelbacillen sind bei Milchuntersuchungen z. B., die infolge Verdachtes auf Eutertuberkulose vorgenommen wurden, schon oft vorgekommen, wenn auch im großen und ganzen gewisse graduelle Unterschiede im tinktoriellen und morphologischen Verhalten der genannten Bacillenarten bestehen, indem die Tuberkelbacillen im allgemeinen säure- und alkoholfester sind als die Milch- und Butterbacillen. Doch lassen sich die Verwechslungen der in der Milch vorkommenden säurefesten Stäbchen mit echten Tuberkelbacillen (so gut wie sicher) vermeiden, wenn die zu untersuchende Milch unter möglichst aseptischen Cautelen gewonnen wird; es dürften auf diese Weise dann Fehldiagnosen nahezu ausgeschlossen sein.

Säurefeste Bakterien fand, wie gesagt, auch Moeller [68]) in pflanzlichen und tierischen Substraten. Es gelang ihm, aus Kuhmist und aus den Darmentleerungen von Pferden, Mauleseln, Ziegen und Schweinen derartige Bacillen zu isolieren. Außer diesem sogenannten **Mistbacillus** fand er bei seinen Untersuchungen nach dem Vorkommen des Tuberkelbacillus im Pflanzenstaub und speziell auch auf dem Timothee-Gras (phleum pratense) je einen säure- und alkoholfesten Bacillus, und er nannte den ersteren allgemein **Grasbacillus II**, den letzteren **Timotheebacillus.** Lecriz [60]) fand auch im Sputum eines an acuter Bronchitis leidenden

Mannes, der angeblich einige Tage vor der Untersuchung Heu aufgeladen hatte, säure- und alkoholfeste Bacillen, die der Ananmese nach wahrscheinlich mit den Moeller'schen Grasbacillen identisch sind. Schon oft haben die Moeller'schen Bacillen, wie wir das aus eben genanntem Beispiel entnehmen können, Veranlassung zur Verwechslung mit Tuberkelbacillen, denen sie ja in morphologischer und tinktorieller Hinsicht fast vollkommen gleichen, gegeben, wenn auch hier wieder gesagt werden muß, daß die Tuberkelbacillen im allgemeinen widerstandsfähiger gegen Alkohol und Säuren sind als die Moeller'schen Bacillen. Vom Smegmabacillus sollen sich diese eben genannten Bacillen, wie bereits erwähnt, durch größere Säure- und Akoholfestigkeit unterscheiden. Auch in der Milch können die Moeller'schen Bacillen sich finden, und zwar durch Verunreinigung derselben mit Kot und Futtermassen, weshalb sie bei der Untersuchung mit Tuberkelbacillen leicht verwechselt werden können.

Einen anderen säurefesten Bacillus, der weder mit den Moeller'schen noch mit den Petri-Rabinowitsch'schen Bacillen übereinstimmt, entdeckte Korn[53]), indem er ihn aus der Freiburger Marktbutter isolierte. Nach Angabe des Entdeckers ist der **Kornbacillus** weniger säurefest als der Tuberkelbacillus, soll aber immerhin noch eine Entfärbung von ca. 1 Minute in 10 prozentigem Salpetersäurespiritus vertragen. Was die Färbbarkeit dieses Bacillus anlangt, so färbt er sich schlecht mit gewöhnlichen Anilinfarben (1 : 100). Gut färbbar dagegen ist er mit Anilinwassergentianaviolett oder Carbolfuchsin, zumal durch Erwärmen. Er nimmt die Gramsche Färbung gut an. In verdünnter, wässriger Methylenblaulösung färbt sich der Bacillus im Gegensatz zu dem Erreger der menschlichen und Geflügeltuberkulose, und zwar nur in jungen Kulturen gleichmäßig. Der Entdecker unterschied zwei Arten dieses Bacillus: Korn I und Korn II.

Vor allem ist noch unter den säurefesten, tuberkelbacillenähnlichen Stäbchen der **Bacillus** der **Pseudoperlsucht** zu nennen, den Moeller[71]) in knotenförmigen Organveränderungen eines Rindes und Schweines fand. Auch hier könnte zur Unterscheidung dieses Bacillus von dem echten Tuberkelbacillus wie bei den Gras-, Mist- und Kornbacillen die Differentialfärbung zwecks Sicherung der Diagnose mit herangezogen werden.

Was weiter den von Hansen[40]) und Neißer[74]) gefundenen **Leprabacillus** anlangt, so steht er nicht nur bezüglich seines färberischen Verhaltens den Tuberkelbacillen nahe, sondern auch in bezug auf Gestalt und Größe, und zwar dermaßen, daß Verwechslungen beider Bacillenarten in lepraverseuchten Gegenden möglich und schon oft vorgekommen sind und so zu Fehldiagnosen geführt haben, zumal die pathologischen Erscheinungen und Veränderungen beider Krankheiten mitunter große Uebereinstimmung zeigen. Am wenigsten sind zur Unterscheidung beider Krankheitserreger die morphologischen Merkmale heranzuziehen, denn diese sind oft viel zu fein, mitunter auch zu variabel, als daß sie praktisch verwendet werden könnten. Konnte doch ein Sichverjüngen der Leprabacillen, wie es von Neißer beobachtet worden ist, von Baumgarten[10]) nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden. Eine Unterscheidung beider Bacillenarten kann mitunter die Lagerung im krankhaft veränderten Gewebe ermöglichen. Denn während die Leprabacillen eine vorwiegend intracelluläre Lagerung zeigen und oft in so großer Anzahl im Zellprotoplasma liegen, daß sie den Zellkern fast ganz verdecken, wissen wir von den Tuberkelbacillen, daß sie vorzugsweise extracellulär liegen und nur ganz vereinzelt intracellulär und dann meist in sternförmiger Anordnung. Das sicherste Mittel zur Unterscheidung beider Bacillenarten ist wohl die differenzierende Färbung. Zwischen beiden Krankheitserregern soll ein

Unterschied in der Aufnahme der Farbflüssigkeiten bestehen, indem die Leprabacillen sich mit basischen Anilinfarbstoffen schneller färben als die Tuberkelbacillen. Nach Baumgarten[19]) existieren zwischen beiden Krankheitserregern keine prinzipiellen Färbungsdifferenzen, sondern nur erhebliche graduelle Unterschiede in der Färbbarkeit resp. Entfärbbarkeit. Er hat folgendes, nur auf graduellen Differenzen beruhendes Differenzialfärbeverfahren zwischen dem Lepra- und dem Tuberkelbacillus aufgestellt.

Für Deckglaspräparate:

1. Färben in verdünnter alkoholischer Fuchsinlösung 6—7 Min. (5—6 Tropfen der gesättigten alkoholischen Lösung auf ein Urschälchen aqua dest.).
2. Entfärben in: 1 Teil Salpetersäure auf 10 Teile Alkohol ¼ Min.
3. Gründlich auswaschen in destilliertem Wasser.
4. Nachfärben in wässriger Methylenblaulösung.

NB. Die Leprabacillen sollen rot, die Tuberkelbacillen ungefärbt sein.

Für Schnittpräparate:

1. Färben in verdünnter alkoholischer Fuchsinlösung 10—15 Min.
2. Entfärben in: 1 Teil Salpetersäure auf 10 Teile Alkohol ½ Min.
3. Gründlich auswaschen in destilliertem Wasser.
4. Nachfärben in Methylenblaulösung 2—3 Min.
5. Entwässern in Alkohol. absolutus 3—4 Min.

Nach Lustgarten[62]) sollen sich beide Bacillenarten durch ihr Verhalten gegen eine 1 prozentige Lösung von unterchlorigsaurem Natron unterscheiden. Die Leprabacillen sollen der Entfärbung in auffallend starker Weise, in viel stärkerer als die Tuberkelbacillen widerstehen.

Voltolini[92]) hatte gefunden, daß die Tuberkelbacillen sich nach vorheriger Behandlung mit rauchender Salpeter-

säure durch die Färbung in perlschnurähnliche Coccenketten verwandeln, während die Leprabacillen dieses Verhalten nicht zeigten.

Wie zahlreiche Nachprüfungen ergeben haben, sind mit den eben genannten Verfahren teils gute Resultate erzielt worden, teils waren auch Mißerfolge zu verzeichnen. Denn wie Wesener[96]) berichtet, hat sich eine Anzahl der angegebenen Differenzpunkte als nicht stichhaltig erwiesen, und auch andere bisher noch unbestrittene Unterscheidungsmerkmale seien alle nicht absolute, sondern beruhten nur auf einem zeitlich verschiedenen Verhalten beider Bacillenarten bei der Färbung resp. Entfärbung. Es seien also die Methoden von Lustgarten, Voltolini und auch Baumgarten nicht in allen Fällen zu einer sicheren Differentialdiagnose zu verwerten.

Da sich jedoch meine nachfolgend berichteten Untersuchungen auf den Leprabacillus nicht mit erstrecken, so will ich es unterlassen, hierauf näher einzugehen.

Um noch einmal auf die **Kaltblütertuberkelbacillen** zu sprechen zu kommen, so ist bezüglich des Fischtuberkelbacillus, der von Bataillon, Dubard und Terre[8]) im Bauchtumor eines Karpfens gefunden worden ist und dessen Eigenschaften von Král, Dubard[54]) und anderen genauer studiert worden sind, zu sagen, daß er morphologisch und tinktoriell dem Bacillus tub. hom. sehr nahe kommt. Als identisch mit dem Fischtuberkelbacillus muß der von Moeller[9]) aus der Milz einer mit tuberkelbacillenhaltigem Sputum geimpften Blindschleiche gewonnene Blindschleichentuberkelbacillus angesehen werden. Weitere derartige Bacillen bei Kaltblütern fanden, wie erwähnt, Weber und Tante[94]) in der Leber von Fröschen, und Küster[56]) konnte solche Bakterien, die offenbar als Saprophyten weit verbreitet in der Natur vorkommen, ebenfalls bei Kaltblütern feststellen. Schließlich ist noch, als in diese Gruppe gehörig

der von Friedmann[34]) in tuberkulösen Organen einer Wasserschildkröte gefundene säurefeste Bacillus zu erwähnen. Alle diese Kaltblütertuberkelbacillen gleichen in morphologischer und tinktorieller Beziehung dem Erreger der menschlichen und Säugetiertuberkulose fast vollkommen. Auf die säurefesten Bakterien, die aus solchen Kaltblütern rein gezüchtet worden sind, welche mit Menschen- oder Rindertuberkelbacillen behandelt waren, will ich nicht eingehen, da es nicht in den Kreis meiner Betrachtung gehört.

Differentialfärbemethoden.

Alle die erwähnten Bakterien haben also mit dem Erreger der Tuberkulose die Säure- und die Alkoholfestigkeit gemeinsam, wenn auch, wie das verschiedene Forscher dargetan haben, und was für die nunmehr zu erwähnenden Färbe- bez. Differentialfärbemethoden benutzt worden ist, die Säure- und Alkoholfestigkeit dieser Bacillen sich von jener des Koch'schen Bacillus mehr oder weniger graduell unterscheidet. So behaupten Abbott und Gildersleeve[1]), daß die meisten säurefesten Bacillen im Gegensatz zu dem Tuberkelbacillus durch 30 prozentige Salpetersäure entfärbt werden. Betreffs des Wesens der Säurefestigkeit dieser Bakterien, d. h. der Eigenschaft, nach einer Färbung mittels basischer Anilinfarbstoffe der nachfolgenden Einwirkung mineralischer Säuren gegenüber die einmal aufgenommene Farbe festzuhalten, spricht R. Koch in seiner „Aetiologie der Tuberkulose“ die Vermutung aus, daß eine die Bacillen umkleidende, mit besonderen Eigenschaften ausgerüstete Hülle existiere, die das Eindringen von Farbstoffen unter gleichzeitiger Einwirkung von Alkalien gestattet, für Säuren dagegen mehr oder weniger undurchgängig ist. Auch Ehrlich[27]) hatte diese Meinung. Die Hypothese wurde jedoch fallen gelassen, als Ziehl[98]) nachgewiesen hatte, daß die Bakterienhülle keineswegs für Säuren undurch-

dringlich ist. Bienstock[14]) und Gottstein[37]) gelang es, auch andere Bakterien durch entsprechende Behandlung mit Fetten säurefest zu machen, und Bienstock war deshalb der Meinung, daß sich die tuberkelbacillenähnlichen Bakterien die Säurefestigkeit durch Wachstum auf fetthaltigen Nährböden erwerben können. Es glaubten also die eben genannten Forscher auf Grund ihrer Untersuchungen, daß die Bacillenhülle aus einer Fettsubstanz bestehe und aus dem umgebenden Gewebe bez. Nährboden gebildet werde. Andere Autoren behaupteten auch, die Hülle werde von den Bacillen selbst durch Zerfallsprodukte des Protoplasmas, z. B. durch Zersetzung der Eiweiskörper, gebildet.

Sämtliche säurefesten Bakterienarten zeigten sich nun mit den einfachsten und gebräuchlichsten Färbemethoden, so nach Koch-Ehrlich, Ziehl-Neelsen, Ziehl-Gabbet etc., wie der Koch'sche Bacillus als rote Stäbchen auf blauem bez. braunem Grunde, so daß also diese Methoden wohl für eine schnelle und oberflächliche Diagnose, nicht aber mehr für einen genauen Nachweis von Tuberkelbacillen genügten. Es mußten neue Methoden gesucht werden, die eine genaue Differenzierung zwischen dem Erreger der menschlichen und tierischen Tuberkulose einerseits und den übrigen säurefesten Bakterienstämmen andererseits ermöglichten.

Differentialfärbemethoden sind mehrere aufgestellt und zum größten Teil auch von anderer Seite ausprobiert worden. Doch gehen bezüglich der Zuverlässigkeit dieser Methoden die Meinungen mitunter sehr auseinander. Im Prinzip stimmen alle Verfahren in folgenden Punkten überein, die nur entsprechend reguliert zu werden brauchen:

1. Ueberfärbung mit einem basischen Anilinfarbstoff in Gegenwart einer Beize.
2. Entfärbung aller Elemente mit Ausnahme des Tuberkelbacillus.
3. Gegenfärbung mit einer Kontrastfarbe.

Die Methoden gründen sich hauptsächlich auf den Unterschied in der Empfindlichkeit der in Frage kommenden Bakterien den Säuren und dem Alkohol gegenüber; denn es sollen, so gefärbt, die Tuberkelbacillen sich durch die Farbe allein von den anderen säurefesten Stäbchen unterscheiden, indem nur letztere sich entfärben bez. die Kontrastfarbe annehmen dürfen.

Ich will nun zunächst die einzelnen **Differentialfärbeverfahren** folgen lassen, dabei erwähnen, wie sich gewisse säurefeste Bakterien zu einigen Methoden verhalten, und im Anschluß hieran die Kritik der Forscher mit beifügen, die diese oder jene Methode auf ihre Brauchbarkeit hin erprobt haben.

Honsell[44]) empfiehlt als sicheres Differentialfärbeverfahren folgende Methode:

1. Färben mit Ziehls Carbolfuchsin.
2. Abspülen in Wasser und Trocknen des Präparates.
3. Präparat 10 Minuten legen in eine Mischung von 3 ccm Salzsäure und 97 ccm Alkohol absolutus.
4. Contrastfärbung in conc. alkoholischer Methylenblaulösung, die zur Hälfte mit Wasser verdünnt ist.

Verfasser dieses Verfahrens weist besonders darauf hin, daß Smegmabacillen verschiedener Herkunft eine verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen Alkohol und Säuren zeigen.

Etwas umständlicher als das eben genannte Verfahren, doch von gleicher Zuverlässigkeit soll die Differentialfärbemethode von Czaplewsky[20]) sein, welche zur Entfärbung, um die Tuberkelbacillen nicht zu sehr zu alterieren, Fluoresceïn benutzt. Es gestaltet sich folgendermaßen:

1. Färben mit erhitztem Carbolfuchsin.
2. Färben in Fluoresceïn-Methylenblau ca. 5 Minuten, bez. Entfärben.
3. Baden des Präparates in conc. alkoholischer Methylenblaulösung $^1/_2$—1 Minute.

4. Abspülen in reinem Wasser.

Das Verfahren läßt, wie Verfasser hervorhebt, an Schnelligkeit und Sicherheit nichts zu wünschen übrig. Er konnte mit ihm auch in zweifelhaften Fällen, wo andere Methoden versagten, Tuberkelbacillen nachweisen und kann daher dasselbe nur für die Praxis empfehlen.

Auch Bunge und Trantenroth[17]) fanden bei Anwendung dieser Methode, daß nach einer Umfärbung von 5 Minuten in der überwiegenden Mehrzahl der Präparate alle Smegmabacillen entfärbt waren, höchstens nur ganz vereinzelte, nicht mehr so intensiv gefärbte, rotviolette Stäbchen gefunden wurden. Indessen scheinen die Tuberkelbacillen nach Ansicht der beiden Autoren eine selbst auf 15 Minuten ausgedehnte Umfärbung ohne Schaden zu vertragen. Nach Angabe von Bunge und Trantenroth genügen die beiden bis jetzt erwähnten Differentialfärbemethoden. Für solche Fälle indessen, wo diese Verfahren versagen, haben die beiden Autoren selbst eine Methode angegeben und erprobt, durch die sie bis jetzt noch nie im Stich gelassen worden seien. Das Verfahren ist folgendermaßen:

1. Fixierung und Entfettung der Präparate durch mindestens 3 Stunden langes Verweilen in absolutem Alkohol.
2. Legen in 5prozentige Chromsäurelösung mindestens 15 Minuten lang.
3. Sorgfältiges Auswaschen der Chromsäure in mehrfach gewechseltem Wasser.
4. Färben mit Carbolfuchsin.
5. Entfärben mit Schwefelsäure (dil.) 3 Minuten oder Salpetersäure (acid. nitr. pur.) 1—2 Minuten.
6. Nochmals entfärben und zugleich gegenfärben in conc. alkoholischer Methylenblaulösung 5 Minuten.

Die vorherige Entfettung schlagen die beiden Autoren vor mit Rücksicht auf die hohe Resistenz mancher Smegma-

bacillen der Entfärbungsflüssigkeit gegenüber, und konnten sie auf diese Weise mit ihrer Methode in keinem der zahlreichen, vom Smegma verschiedener Personen angefertigten Präparate Bacillen finden, während solche in den Kontrollpräparaten immer zahlreich vorhanden waren. Die Tuberkelbacillen dagegen waren immer noch deutlich rot gefärbt, selbst bei einem Aufenthalt der Präparate in absolutem Alkohol von 24 Stunden, in der Chromsäure von 1 Stunde und in der conc. alkoholischen Methylenblaulösung von 20 Minuten. Bei Sputumuntersuchungen soll sich vor allem die Methode sehr bewährt haben. Bei Urinuntersuchungen empfehlen Bunge und Trantenroth, da sowohl Smegma- als auch Tuberkelbacillen infolge der ammoniakalischen Harngährung eine größere Empfindlichkeit gegen Entfärbungsmittel zeigen und so direkt entfärbt werden können, die Smegmabacillen auf mechanische Weise auszuschalten durch Kathetrisieren oder durch Reinigen des Harn- und Geschlechtsapparates vor der Entnahme des Untersuchungsmaterials.

Pappenheim[79]) hat, um Irrtümer in der Diagnose auszuschalten, folgendes Färbeverfahren aufgestellt, indem er das von Czaplewski verwendete Fluoresceïn durch das stärker entfärbende Korallin ersetzte.

1. Färben in erhitztem Carbolfuchsin kurze Zeit (den überschüssigen Farbstoff ablaufen lassen).
2. Entfärben und Gegenfärben (3—5 mal eintauchen) in folgender Lösung: In 100 Teilen absoluten Alkohols wird ein Teil Korallin gelöst, Methylenblau bis zur vollständigen Sättigung hinzugefügt und diese Lösung mit 20 Teilen Glyzerin versetzt.
3. Abspülen in Wasser etc.

Ein weiteres Differentialfärbeverfahren, das in der Hauptsache auf der Wirkung des Alkohols beruht, ist die Färbemethode nach Weichselbaum[95]).

1. Färben mit Carbolfuchsin.
2. Abspülen in Wasser und Trocknen des Präparates.
3. Legen in eine conc. alkoholische Methylenblaulösung 5—10 Minuten.
4. Abspülen etc.

Die Smegmabacillen und damit auch die anderen säurefesten Stäbchen sollen danach entfärbt bez. blau, die Tuberkelbacillen hingegen rot gefärbt sein.

Mehrfach sind auch Versuche gemacht worden, an Stelle der Mineralsäure organische Säuren zur Unterscheidung resp. Entfärbung zu benutzen. Doch spätere Nachprüfungen haben ergeben, daß ihnen nicht der zugeschriebene Wert zukommt. So empfahlen Alvarez und Tavel[2]) sowie G. Klemperer[52]) den Eisessig und die Oxalsäure. Noch wenig nachgeprüft ist in dieser Hinsicht das Hauser'sche[41]) Verfahren, nach dem Citronen-, Weinstein- und Pikrinsäure zur Entfärbung verwendet werden. Es sollen auf diese Weise die mit Ziehl'scher Lösung gefärbten Smegmapräparate schnell entfärbt werden, während die Tuberkelbacillen schön rot gefärbt bleiben bei Anwendung von 5—10 prozentigen Lösungen dieser Säuren. Lesieur[59]) empfiehlt an Stelle der drei genannten organischen Säuren zur Entfärbung der mit Carbolfuchsin gefärbten Präparate Milchsäure, besonders in 2 prozentiger alkoholischer Lösung.

Ueber eine weitere Differentialfärbemethode des Bac. tub. hom., des Bac. tub. avis, des Lepra- und des Smegmabacillus berichtet Marzinowski[65]). Sein Verfahren ist folgendes:

1. Färben mit verdünntem Carbolfuchsin 3—5 Minuten. (auf 2 Teile Wasser 1 Teil Carbolfuchsin).
2. Abspülen in Wasser.
3. Färben mit Löfflers Methylenblau 2—3 Minuten.

Der Bac. tub. hom. konnte auf diese Weise im Gegensatz zu den anderen genannten säurefesten Bacillenarten nicht gefärbt werden.

Der Bac. tub. avis färbte sich ziemlich leicht rot und wurde durch Alkohol nicht wieder entfärbt.

Der Leprabacillus färbte sich auch rot und zeigte nicht selten granulierte Formen.

Der Smegmabacillus nahm ebenfalls die rote Farbe an und färbte sich darauf mit Methylenblau blau bez. blauviolett.

Marzinowski hat die Verwendbarkeit dieser Methode auf verschiedene Arten der säurefesten Mikroorganismen nachgeprüft und ist überzeugt, daß sie zur Unterscheidung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Bacillen benutzt werden kann.

Ueber eine weitere Differentialfärbemethode von Brieger[16]) berichtet Klemperer[52]); dieselbe ist folgendermaßen:

1. Färben mit bis zum Kochen erhitzter Thymolfuchsinlösung.
2. Abspülen der Präparate in Wasser.
3. Legen der Präparate in conc. Salzsäure 5—10 Sekunden.
4. Abspülen in Wasser.

Auf diese Weise sind nur die Tuberkelbacillen gut gefärbt. Um nur die anderen säurefesten Bacillen zu färben (z. B. die Smegmabacillen), empfiehlt Brieger[16]), die mit Thymolfuchsinlösung gefärbten Präparate, anstatt in Salzsäure, in 2prozentiger Oxalsäure oder in Eisessig zu entfärben. Auch Bitter[15]) wendete außer Säurealkohol Eisessig zur Entfärbung an und fand, daß nach 2 Minuten Einwirkung die Smegmabacillen erblaßten, während die Tuberkelbacillen gefärbt blieben. Ebenso sollen sich die meisten Smegmabacillen entfärben, wenn man auf mit Anilinwassergentianaviolett gefärbte Präparate die Salpetersäure (1 : 2) 15—20 Sekunden einwirken läßt; vollständige Entfärbung der Smegmabacillen soll eintreten, wenn man nach der Salpetersäureeinwirkung die Präparate mit absolutem Alkohol behandelt.

Die Tuberkelbacillen sollen dabei gut gefärbt bleiben. Nach Bitter[15]) gibt es kein absolut sicheres differentialdiagnostisches Moment, speziell zwischen den Tuberkel- und den Smegmabacillen. Auch einzelne von ihm selbst angegebene Unterscheidungsmerkmale seien von nur geringem Werte, so z. B. die successive erfolgende Entfärbung der Smegmabacillen bei längerer Einwirkung der Salpetersäure, während die Tuberkelbacillen nach einer gewissen Entfärbungsdauer auf einmal erblassen, ferner die Beobachtung, daß die mit Anilinwassergentianaviolett gefärbten Smegmabacillen beim Nachfärben mit Vesuvin den Ton dieses Farbstoffes annehmen können, was die Tuberkelbacillen nicht tun.

Dorset[24]) färbte mit Sudan III direkt das Fett (Wachs) des Tuberkelbacillus; seine Methode ist folgende:

1. Fixieren und Färben in gesättigter kalter Lösung von Sudan III in 80prozentigem Alkohol 5—10 Minuten.
2. Auswaschen ebenso lange in 70prozentigem Alkohol.

Nach dieser Methode sollen nur die Tuberkelbacillen gefärbt werden, keine anderen, vor allem keine Smegmabacillen.

Fontes[29]), welcher Untersuchungen über die chemische Natur der den Tuberkelbacillen eigenen Fett- und Wachsarten und über das Phänomen der Säureresistenz anstellte, schlägt folgende Differentialfärbemethode vor:

1. Färben mit Carbolfuchsin.
2. Abspülen in Wasser.
3. Färben mit Carbolkristallviolett zirka 2 Minuten.
4. Behandeln des Präparates mit Lugol'scher Lösung (bis sich kein Metallspiegel mehr bildet).
5. Entfärben in Acetonalkohol (aa).
6. Abspülen in Wasser.
7. Nachfärben mit Methylenblaulösung.

Die Tuberkelbacillen sollen nach dieser Methode rot gefärbt sein und violette Granula aufweisen.

Die anderen säurefesten Stäbchen sollen violett gefärbt sein und dichtere Granula zeigen.

v. Betegh[13]) stellte als neues Differentialfärbeverfahren die b-Tolin-Methode auf. Es werden auf diese Weise die Bakterienhülle rot, die sogenannten Sporen hingegen schwarzblau gefärbt, und es sollen darnach die Tuberkelbacillen durch bestimmte Strukturunterschiede von den Leprabacillen, den Vogeltuberkelbacillen, vor allem aber von den säurefesten Saprophyten (Smegma-Milchbacillen etc.) zu trennen sein.

Beschreibung der Methode:

1. Fixieren der dünnen, lufttrockenen Aufstriche aus Reinkultur über der Flamme.
2. Beizen mit 2—3 Tropfen 15 prozentiger Salpetersäurelösung.
3. Erhitzen über der Flamme, bis außerhalb derselben feine Dämpfe aufsteigen.
4. Abspülen in Wasser.
5. Färben mit Carbolfuchsin-Methylenblau unter Erhitzen.
6. Abspülen gründlich in Wasser.
7. Entfärben mit 60 prozentigem Alkohol.
8. Abspülen in Wasser, Trocknen, Einbetten etc.

Jamamoto[97]) benutzte zur Unterscheidung der Lepra- und Tuberkelbacillen die Silberimprägnationsmethode, die sich folgendermaßen gestaltet:

1. Die lufttrockenen Präparate werden in der Flamme vorsichtig fixiert und
2. 10 Minuten lang in 5 prozentiger Silbernitratlösung bei 55—60° C erwärmt, dann
3. 5 Minuten lang in folgende Reduzierungslösung gebracht (acid. pyrogall. 2,0, acid. tann. 1,0, aq. dest. ad 100,0).

4. Der entstandene schwarze Niederschlag auf den Präparaten wird mit zusammengefaltetem, erweichtem Filtrierpapier entfernt.
5. Trocknen, Einbetten etc.

Die Tuberkelbacillen erscheinen, durch Silber imprägniert, schwarz, die Leprabacillen weiß auf dunklem Grund.

Lustgarten[62]) stellte zur Differenzierung der von ihm gefundenen, wahrscheinlich mit dem Smegmabacillus identischen, säurefesten Bakterien von dem Tuberkelbacillus folgendes Färbeverfahren auf:

1. Färbung der (möglichst feinen) Schnitte in Ehrlich-Weigert'scher Gentianaviolettlösung, zunächst 12—24 Stunden bei Zimmertemperatur, sodann 2 Stunden bei 40° C (Brutschrank).
2. Abspülen in absolutem Alkohol mehrere Minuten.
3. Uebertragung mittels rechtwinklig gebogener Platin- oder Glasnadel in ein Urschälchen, das mit zirka 3 ccm einer 1½ prozentigen wässrigen Lösung von übermangansaurem Kalium gefüllt ist (es entsteht ein brauner, flockiger Niederschlag von Manganhyperoxyd), und 10 Sekunden darin verweilen lassen.
4. Entfärben in reiner schwefliger Säure momentan oder ganz kurze Zeit.
5. Abspülen in destilliertem Wasser.
6. Ein zweites Mal in die Kaliumpermanganatlösung bringen (nur 3—4 Sekunden) und so fort, bis die Schnitte völlig farblos erscheinen, was in der Regel nach einer 3—4 maligen Wiederholung der Färbungsprozedur eintritt.
7. Entwässern in absolutem Alkohol.
8. Aufhellen in Nelkenöl, Einbetten etc.

Trockenpräparate von Sekreten oder Gewebssaft werden ähnlich behandelt; nur soll an Stelle des absoluten Alkohols mit destilliertem Wasser abgespült werden, und die genannten

chemischen Stoffe dürfen entsprechend der geringen Dicke der Präparate nur kürzere Zeit einwirken.

de Giacomi[36]) stellte folgendes Differentialfärbeverfahren auf:

1. Die Deckglastrockenpräparate werden nach gewöhnlicher Fixation derselben in der Flamme, in Fuchsinlösung wenige Minuten lang leicht erwärmt, sodann
2. in Wasser, dem einige Tropfen Eisenchloridlösung zugesetzt sind, abgespült.
3. in conc. Eisenchloridlösung entfärbt.

Die Lustgarten'schen Bacillen (wohl Smegmabacillen) bleiben rot, alle anderen vorhandenen Bakterien sollen sich entfärben. Diese Methode hält Verfasser für bequemer als das Lustgarten'sche Verfahren; sie ist nach Gottstein[37]) auch für Schnittpräparate anwendbar. Es werden die 24 Stunden in Fuchsinlösung gefärbten Schnitte, nach Abspülung in destilliertem Wasser, wenige Sekunden in eine reine oder verdünnte Lösung von Eisenchlorid gebracht, darauf in Alkohol abgespült, aufgehellt und eingebettet. Gottstein fand, daß die Bacillen nach der Lustgarten'schen Methode nicht immer rot, sondern oft dunkelviolett gefärbt waren, und er konnte diese Violettfärbung auch mit Gentianaviolett erzielen. Der ebengenannte Autor bestätigt zwar, daß andere Bakterien (Milzbrand-, Pyaemie-, Typhus-B. etc.) durch das Verfahren von de Giacomi entfärbt werden, indessen erschienen Tuberkelbacillen, selbst nach einem Aufenthalt von 24 Stunden in Eisenchloridlösung, noch stark gefärbt.

E. v. Leyden[61]) empfiehlt zur Differenzierung der Smegma- und Tuberkelbacillen folgende Farbenreaktionen:

1. Smegmabacillen, gefärbt mit Anilinfarben, entfärben sich durch 1—2 Minuten dauernde Behandlung mit Säurealkohol, während die Tuberkelbacillen bei gleicher Behandlung die Farbe festhalten.

2. Smegmabacillen geben, nach Gram gefärbt, die Farbe ab, was bei den Tuberkelbacillen nicht der Fall ist.
3. Ein Tuberkelbacillenpräparat, 8—10 mal durch die Flamme gezogen und mit heißer Ziehl'scher Lösung gefärbt, läßt eine perlschnurartige Struktur der Tuberkelbacillen erkennen, während die Smegmabacillen so behandelt, als solide Stäbchen erscheinen. Voltolini[92]) hält diese perlschnurartig gekörnte Struktur der Tuberkelbacillen für ein absolut sicheres Erkennungszeichen, das zur Unterscheidung der Tuberkelbacillen von den anderen, säurefesten Stäbchen verwendet werden könne. Lege man nämlich Tuberkelbacillenpräparate vor der Färbung ganz kurze Zeit in frische, stärkste und unverdünnte Salpetersäure (acid. nitr. fumans, D = 1,45—1,50), so erschienen an den nach Ehrlich gefärbten Präparaten die Tuberkelbacillen konstant perlschnurartig gekörnt, eine Erscheinung, welche man übrigens auch ohne die genannte, vorbereitende Maßregel häufig an den gefärbten Tuberkelbacillen beobachte. Diese Strukturverhältnisse konnte Voltolini nur bei den Tuberkelbacillen konstatieren.

Eine speziell zur Färbung des Tuberkelbacillus empfohlene Methode ist die des französischen Gelehrten Herman[42]). Derselbe wendet zur Färbung eine 3 prozentige Lösung von Kristallviolett in 95 prozentigem Aethylalkohol an. Als Beize benutzt er eine 1 prozentige Lösung von kohlensaurem Ammoniak in destilliertem Wasser (1 Teil Farbstofflösung wird mit 3 Teilen Beize jedesmal frisch vermengt). Die Entfärbung wird mit Alkohol und 10 prozentiger Salpetersäure vorgenommen. Mit diesem Verfahren will Verfasser Tuberkelbacillen nachweisen können, auch in Fällen, wo das gewöhnliche Ziehl'sche Verfahren im Stiche

läßt. Die Resultate sollen noch günstiger sein als mit der Much'schen Methode.

Kühne[55]) machte die Erfahrung, daß durch Methylenblaunachfärbung, sei es infolge des blaugefärbten Schleimes oder sei es infolge Umfärbung, ein Teil der rot gefärbten Tuberkelbacillen sich der Beobachtung entziehe. Um diesen Uebelstand auszuschalten, konstruierte er ein neues Verfahren, das darin besteht, die Sputumpräparate nach Färbung mit kaltem Carbolfuchsin und gründlicher Entfärbung in starker Säure, in einem Tropfen mit Pikrinsäure leicht gelb gefärbten Anilinöls zu untersuchen. Das Verfahren verbindet, wie Verfasser betont, Einfachheit und diagnostische Sicherheit miteinander und ist daher besonders für die Praxis anwendbar. Da nach diesem Verfahren nur die Tuberkelbacillen gefärbt werden, müssen, wenn es darauf ankommt, auch andere Mikroorganismen nachzuweisen, besondere Präparate mit Methylenblaunachfärbung angefertigt werden. Die Methode ist, genau beschrieben, folgende:

1. Beschickung der Deckgläser und Einbrennen.
2. Färben in kaltem Carbolfuchsin 5 Minuten.
3. Gründliches Entfärben in 30prozentiger Schwefel- oder Salpetersäure.
4. Abspülen in Wasser und Trocknen.
5. Untersuchung in einem Tropfen mit Pikrinsäure leicht gelb gefärbten Anilinöls.

Bei Dauerpräparaten entfärbt man nach Behandlung mit der starken Mineralsäure noch in Pikrinsäure, die mit Wasser verdünnt ist.

Arens[4]) stellte folgendes Differentialfärbeverfahren für Tuberkelbacillen auf:

1. Färben mit Chloroformfuchsin 4—6 Minuten.
2. Entfärben in salzsaurem Alkohol.
3. Abspülen in Wasser resp. Alkohol.
4. Nachfärben mit Methylenblau.
5. Abspülen in Wasser etc.

Verfasser empfiehlt die Methode zur Untersuchung von Milch auf Tuberkelbacillen und hebt hervor, daß Milchbakterien mit Chloroform-Methylenblau (3—4 ccm Chloroform und 12—15 Tropfen gesättigte, alkoholische Methylenblaulösung) in 4—6 Minuten dunkelblau gefärbt werden. Doch dürfte sich das Chloroform wegen der sich entwickelnden, unangenehmen Dämpfe nicht zur Anwendung bei Färbemethoden eignen.

Kaufmann[49]) stellte ein einfaches Verfahren zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Auswurf auf. Er bedient sich an Stelle der zur Differenzierung der Tuberkelbacillen von anderen in den zu untersuchenden Flüssigkeiten und Geweben vorhandenen Bakterien als Entfärbungsmittel verwendeten Säuren oder der etwas zeitraubenden, teilweisen Umfärbung einfach des siedenden Wassers. Verfasser glaubt damit ein praktisches, allerdings nicht ganz so schöne Bilder, wie so manche andere Methode lieferndes Verfahren aufgestellt zu haben.

Es werden die getrockneten und in Alkohol oder über der Flamme fixierten Sputum-Deckglaspräparate

1. mit heißem Carbolfuchsin gefärbt,
2. ½ bis 3 Minuten in siedendem oder in 98—99° C heißem Wasser hin- und hergeschwenkt.

Man kann nun, falls man keine Kontrastfärbung, die sehr gut gelingt, vornehmen will, ohne weiteres in Wasser untersuchen und findet die Tuberkelbacillen dunkelrot auf grauweißlichem Grunde. Für Schnitte ist die Methode wenig geeignet, und konnten nach ihr auch die Leprabacillen gefärbt werden.

Schütz[88]) hat die morphologischen, tinktoriellen und kulturellen Eigenschaften der säurefesten Pilze (Butter-, Gras-, Mistbacillen etc.), die häufig Anlaß zur Verwechslung mit dem Tuberkelbacillus gegeben haben, geprüft und die Merkmale für eine sichere Unterscheidung zwischen dem Butter-, Gras- und Mistbacillus einerseits und dem Tuberkel-

bacillus andererseits festgestellt. Nach seinen Untersuchungen färben und entfärben sich die säurefesten Bacillen schneller als der Tuberkelbacillus. Der Erreger der Tuberkulose gibt die einmal aufgenommene Farbe auch dann nicht ab, wenn die Präparate minutenlang in einer Mischung von Schwefelsäure oder Salpetersäure mit Wasser (1:2) gelegen haben.

de Angelis[3]) empfiehlt eine Färbemethode für Tuberkelbacillen, die bei Vergleichung mit dem Ziehl'schen Verfahren dieses an Zuverlässigkeit übertroffen haben soll.

Nach Trocknen und Fixieren wird das Präparat nacheinander mit folgenden Mischlösungen gefärbt.

a) Liquor. Ammonii caustici (26° B) 20 + aq. dest. 40, filtriert.

b) gesättigte alkoholische Gentianaviolettlösung.

c) acidi sulfuric. (66° B) 10 + aq. dest. 40, filtriert.

d) gesättigte alkoholische Lösung von Chloridin.

1. Drei Teile der Lösung a werden mit 7 Teilen der Lösung b gemischt; davon wird auf die Präparate geträufelt und erhitzt, bis Blasen und ein goldiger Metallglanz entstehen.

2. Abkühlen.

3. Gut abspülen in Wasser.

4. Es werden einige Tropfen der Lösung c auf das Präparat gebracht, bis das Violett verschwunden ist und dafür das Präparat einen leicht gelblichen Farbenton annimmt.

5. Abgießen dieser Lösung.

6. Behandeln des Präparates mit Lösung d 1—2 Minuten.

7. Abspülen in Alkohol. Trocknen etc.

Die Tuberkelbacillen erscheinen violett auf goldgelbem Grunde.

In einigen der erwähnten Färbemethoden wurden auch andere Stoffe als Beizen benutzt. So z. B. wendete B. Fränkel[32]) Ortho-Toluidin, Prior[83]) Terpentinöl, Ehrlich[27]) Aldehyde an. B. Fränkel bezeichnet deswegen

sein Färbungsverfahren nur als eine unwesentliche Modifikation des Gabbet'schen Verfahrens. Was die Farbflüssigkeiten anlangt, so färben unter anderen Lübinoff[65]) mit Borfuchsin, Nastinkow und Pewsner[73]) mit Sublimatlösungen von Anilinfarben. Andere Forscher wieder änderten die Entfärbungsflüssigkeit. So entfärben Peters[81]) Carbolfuchsin-Präparate mit unterschwefliger Säure, Kühne[55]) mit 2‰iger Lösung von salzsaurem Anilin. Neuerdings benutzen Rondelli und Buscalioni[86]) zur Entfärbung das Eau de Javelle (6 g Calciumhypochlorid, in 60 g destilliertem Wasser gelöst, werden mit einer Lösung von 12 g Kalium carbonicum in 40 g Wasser gemischt). A. Müller[72]) entfärbt Carbolfuchsinpräparate in 5—10 prozentigem Kaliumpercarbonat ca. 1/4 Stunde, oder noch besser in Wasserstoffsuperoxyd (12—13 Vol. Prozent durch Soda oder Pottasche leicht alkalisiert) einige Minuten. Nach dieser Variation von Müller sollen nur die Tuberkelbacillen nicht entfärbt sein, und soll sich diese Methode zur Untersuchung für Fälle mit wenig Tuberkelbacillen und zur Sporenfärbung eignen.

Was nun die Beurteilung der genannten Differentialfärbemethoden auf Grund von Nachuntersuchungen anlangt, so prüfte L. Rabinowitsch die Methoden von Honsell, Bunge und Trantenroth nach, erhielt aber damit immer nur negative Resultate. Ebenso berichtet A. Moeller, daß sich mit den Verfahren von Bunge und Trantenroth und Pappenheim der Tuberkelbacillus genau so färbe wie der Smegmabacillus. Nach Grethe sind die gebräuchlichen Färbemethoden von Lustgarten, de Giacomi, Alvarez und Tavel zur Darstellung von Smegmabacillen und zur Differenzierung derselben von den Tuberkelbacillen nicht zu verwerten, da die Tuberkelbacillen auf diese Weise, wenn auch teilweise nur blaß, wie nach de Giacomi, doch hinreichend gefärbt werden, um eine Verwechslung der genannten Bacillenarten möglich zu machen. Ebensowenig brauchbar

sei das Färbeverfahren von B. Fränkel zur Differenzierung, das im Gegenteil sogar recht gut zur Darstellung der Smegmabacillen dienen könne. Doch hält Grethe die getrennte Entfärbung in Säure oder Alkohol bei vorsichtigem Gebrauche und genügend langer Einwirkung des Alkokols für brauchbar. Die sichersten Methoden seien die von Czaplewski und Weichselbaum. A. Fränkel wandte zur Differenzierung der Smegma- und Tuberkelbacillen, die seiner Meinung nach nur in Ausnahmefällen für die Praxis in Betracht komme, das Verfahren von Honsell an, und er hält die entfärbten Stäbchen für Smegmabacillen, während die rot gefärbten nach seiner Ansicht Tuberkelbacillen sind. Reper[85]) prüfte die Methode von Pappenheim zur Unterscheidung der Smegma- und Tuberkelbacillen sowohl an Ausstrichpräparaten wie an Reinkulturen nach und hat damit günstige Resultate erzielt. Bunge und Trantenroth haben äußerst interessante Untersuchungen über die färberische Unterscheidung der Tuberkel- und Smegmabacillen angestellt und folgende Resultate erhalten: Die Morphologie allein ermöglicht keine brauchbare Differenzierung. Die Smegmabacillen verhielten sich oft außerordentlich verschieden der Färbung und Entfärbung gegenüber. Unbrauchbar zur färberischen Unterscheidung seien alle Methoden, die nur Säuren zur Entfärbung verwenden, besonders das Verfahren von Gabbet. Nicht verwendbar seien auch die Verfahren, bei denen außer Säure noch Alkohol in irgendeiner Verdünnung benutzt wird, so die Methoden von B. Fränkel und Ziehl-Neelsen. Brauchbar, aber auch nicht absolut sicher, seien solche Methoden, bei denen man mit absolutem Alkohol mindestens 5 Minuten entfärbt, z. B. die Färbeverfahren nach Weichselbaum und Czaplewski. Diese beiden Methoden hat auch Pappenheim zur Differenzierung der Smegma- und Tuberkelbacillen angewendet und damit in den meisten Fällen günstige Re-

sultate erzielt. Le Doux[25]) prüfte die Methode von Dorset nach, erhielt aber immer nur negative Ergebnisse, Dahms[22]) dagegen empfiehlt diese Methode. Das Differentialfärbeverfahren von Pappenheim prüfte auch Reper nach, und zwar wandte er es zur Unterscheidung der Smegma- und Tuberkelbacillen sowohl an Ausstrichpräparaten wie an Reinkulturen an; er will damit günstige Resultate erzielt haben. Honsell probierte verschiedene Differentialfärbemethoden zur Unterscheidung von Tuberkel- und Smegmabacillen, und er betont gegenüber Grethe, daß am ehesten eine Differenzierung durch conc. Alkohol als Entfärbungsmittel möglich ist, daß aber Alkohol, mit Säure gemischt, energischer und gleichmäßiger wirke, trotzdem aber noch eine Zeit von 10 Minuten nötig sei, um die Smegmabacillen zu entfärben. Das Verfahren von Kühne hält Czaplewski auf Grund seiner Nachprüfung zum Nachweis von Tuberkelbacillen nicht für geeignet, denn erstens dauere die Färbung in kalter Carbolfuchsinlösung zu lange, ferner würden durch die Entfärbung in 30 prozentiger Schwefel- oder Salpetersäure die Tuberkelbacillen oft zu einem großen Teil erblassen, vor allem aber würden durch diese Methode die für die Diagnose mitunter so wichtigen accidentellen Mikroorganismen nicht mit zur Anschauung gebracht.

Außerdem haben noch folgende Autoren Untersuchungen über säurefeste Bakterien und ihre färberische Unterscheidung von dem Tuberkelbacillus angestellt.

Petterson[82]) betrachtete vergleichend die Butterbacillen von Petri und Rabinowitsch, den Gras-, Timothee- und Mistbacillus (von Moeller), sowie den Blindschleichentuberkelbacillus von Moeller. Nach Verfasser sind alle diese verwandten Mikroorganismen in verschiedenem Grade säurefest. Timothee- und Mistbacillus halten die Farbe energischer fest, als der Tuberkelbacillus. Die Bacillen von Petri und Rabinowitsch hält Petterson nicht für identisch,

dagegen glaubt er, daß die Petri'schen Bacillen mit dem Moeller'schen Grasbacillus identisch seien.

Kayser[50]) gelangt durch vergleichende Untersuchungen mit Tuberkelbacillen, Timotheebacillen Moeller und Butterbacillen Rabinowitsch zu dem Schluß, daß tinktorielle Unterschiede zwischen diesen Arten am wenigsten in die Augen fallen; am leichtesten sei aber die Differenzierung durch die Kultur auf Glycerinagar.

In einem Resumée stellt Moeller[68]) die Tuberkelbacillen den Gras-, Mist-, Butter- und Milchbacillen gegenüber und verwirft die färberischen und morphologischen Momente als Unterscheidungsprinzip, sondern hält nur die kulturellen Eigenschaften als ausschlaggebend für die Diagnose.

Courmont und Potet[19]) geben eine zusammenfassende Uebersicht über die säurefesten Bakterien und betonen, daß zwischen allen Vertretern dieser Gruppe die größte Verwandtschaft besteht, und es gäbe kein absolut sicheres Merkmal, durch das sich der Koch'sche Bacillus von den übrigen säurefesten Stäbchen unterscheide. Die Unterscheidungspunkte seien derart, daß sie teils durch Modifikation des Nährbodens, teils durch andere Aenderungen aufgehoben werden können. Auch die Pathogenität sei kein einwandfreies Charakteristikum für die Tuberkelbacillen.

Aujezky[6]) weist darauf hin, daß die Unterscheidung des Tuberkelbacillus von den anderen säurefesten Stäbchen wissenschaftlich und praktisch sehr wichtig, aber auch sehr schwierig ist. Die mikroskopische bez. mikrochemische Untersuchung genüge nicht mehr. Morphologisch seien nur die sehr kurzen, dicken Stäbchen vom Tuberkelbacillus zu unterscheiden. Nach Verfasser gibt es keine Färbemethode, durch die man alle tuberkelbacillenähnlichen Bakterien von dem Erreger der Tuberkulose sicher trennen kann. Denn manche säurefeste Stäbchen verhielten sich

hinsichtlich der Entfärbung mit Säure oder Alkohol ganz wie der Tuberkelbacillus, und würden in solchen Fällen auch die sonst gebräuchlichen Verfahren (Marzinowsky, Weichselbaum, Honsell, Bunge und Trantenroth) unzuverlässig sein. Der Grad der Säurefestigkeit könne sich unter gewissen Umständen mitunter sehr ändern, je nach der Beschaffenheit des Nährbodens, dem Alter der Kultur etc. Manche Bakterien seien in jungem Zustand säurefester als in älterem, so z. B. der Grasbacillus II Moeller. Während also manche säurefeste Bakterien verhältnismäßig leicht vom Tuberkelbacillus zu unterscheiden seien, gäbe es auch welche, die die Eigenschaften desselben in dem Maße annehmen, daß man oft nur mit Berücksichtigung sämtlicher Unterscheidungsmerkmale, und dann vielfach noch nicht sicher, eine Trennung ermöglichen kann.

Cazottes[18]) studierte die säurefesten Bacillen genau in ihrem Färbungs- und Entfärbungsverhalten nach den verschiedenen Methoden und stellte auf Grund seiner Untersuchungen fest, daß die Schwierigkeit, diese Bacillen im Gegensatz zu dem Tuberkelbacillus zu entfärben, verschieden ist, je nach dem Alter der Kultur, nach dem Kulturmedium und je nach dem benutzten Verfahren. Auf festen Medien kultiviert oder aus pathologischen Bestandteilen entnommen, soll der Tuberkelbacillus resistenter gegen die Entfärbung sein als die anderen säurefesten Stäbchen.

Gasis[35]) erwähnt in seiner Arbeit, daß die bis jetzt bekannten, auf der Säurefestigkeit beruhenden Differentialfärbemethoden bei Urinuntersuchungen auf Tuberkelbacillen oft im Stiche ließen. Nach ihm liegen die Fehler dieser Methoden in dem Färbungs- und Entfärbungsakt. Gasis hat die Verfahren von Honsell, Bunge und Trantenroth, Hauser, Czaplewski und Pappenheim zur Unterscheidung der Smegma- und Tuberkelbacillen nachgeprüft und gefunden, daß die Methoden von Czaplewski,

Pappenheim, Bunge und Trantenroth sich zur Differenzierung eignen, allerdings würden manche Formen der Tuberkelbacillen nicht zur Anschauung gebracht. Die Methoden von Honsell und Hauser dagegen seien ungeeignet, da sie viele Smegmabacillen gefärbt ließen.

Alle erwähnten Differentialfärbemethoden nun, die fast ausschließlich auf der Säurefestigkeit beruhen und basische Anilinfarben benutzen, sind also, wie ich das durch Belege in der angeführten Literatur genügend dargetan zu haben glaube, teilweise recht verschieden in bezug auf ihre Brauchbarkeit beurteilt worden. Denn während der eine Autor auf Grund seiner Nachprüfungen eine Methode empfiehlt, berichtet der andere Autor, daß er mit demselben Verfahren nur negative Resultate erzielt habe. So eminent wichtig es aber wäre, schon durch die mikroskopische Untersuchung mit Sicherheit Tuberkulose diagnostizieren, das heißt eine vollständige färberische Unterscheidung der Tuberkelbacillen von den anderen, hauptsächlich für die Verwechslung in Frage kommenden säurefesten Bakterien herbeiführen zu können, so glaube ich doch auf Grund der einschlägigen Literatur, daß bis jetzt keines der auf der Säurefestigkeit beruhenden Verfahren eine durchgreifende tinktorielle Differenzierung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Bacillen ermöglicht.

Besonderes Interesse erregte es daher, als Gasis[35]) uns ein neues, auf einer neuen Reaktion der Tuberkelbacillen, der Alkalifestigkeit, beruhendes Differentialfärbeverfahren mitteilte, das, wie er angibt, frei sei von allen Fehlern der üblichen, auf der Säurefestigkeit beruhenden und zur färberischen Unterscheidung des Tuberkelbacillus von den anderen säurefesten Bacillen verwendeten Methoden. Seine Versuche erstrecken sich hauptsächlich auf die Unterscheidung des Tuberkel- und Smegmabacillus bei Urinuntersuchungen etc., und hierbei fand Gasis, daß der Smegmabacillus im

Gegensatz zu dem Tuberkelbacillus nicht alkalifest ist. Diese Alkalifestigkeit der Tuberkelbacillen führt Verfasser auf proteinhaltige, vielleicht in der Wachshülle enthaltene Substanzen zurück, und er behauptet, mit dieser Methode lasse sich eine Form von Tuberkelbacillen nachweisen, welche mit den bisherigen Verfahren nicht ermittelt werden konnte.

Das Verfahren ist folgendermaßen:

1. Vorbereiten des Farbstoffes mit der Beize. Einige Kubikzentimeter (5 ccm) einer 1 prozentigen Eosinlösung (1 g kristallisiertes Eosin, 5 ccm absoluter Alkohol, 95 ccm destilliertes Wasser) werden mit einem ungefähr linsengroßen Stück Quecksilberchlorid im Reagensglas langsam unter Umschütteln gekocht, bis das Quecksilberchlorid sich ganz auflöst. Der Farbstoff nimmt dann eine hellere Nuance an und setzt sich in Schwebefällung.
2. Das fixierte Ausstrichpräparat wird 1—2 Minuten lang mit warmer Farblösung bedeckt.
3. Dann in Wasser abgespült und mit dem Entfärbungsmittel übergossen (0,5 Natriumhydrat; 1,0 Kaliumjodid; 100,0 50prozentiger Alkohol), bis die rote Farbe verschwunden ist und eine weiß-grüne Farbe auftritt.
4. Entfernung des Entfärbungsmittels durch absoluten Alkohol. Gründliche Wasserabspülung.
5. Kontrastfärbung mit Methylenblaulösung (1 g kristallisiertes Methylenblau, 10 ccm absoluter Alkohol, ½ ccm Salzsäure, 90 ccm destilliertes Wasser) auf 2—3 Sekunden.

Gründliche Wasserspülung, Trocknen in leichter Flamme, Einbetten.

Sollte nach der Wasserbehandlung das Präparat noch rot erscheinen, dann wird dieselbe Prozedur wiederholt

(Entfärbungsmittel, Alkohol, Wasser), bis das Präparat entfärbt wird.

Da nach den Angaben von Gasis die Hoffnung nicht ganz unbegründet erschien, nach seinem Verfahren eine sichere Trennung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Bacillen durchführen zu können, unternahm ich es auf Veranlassung von Herrn Professor Dr. Klimmer, das Gasis'sche Verfahren nachzuprüfen. Außerdem versuchte ich noch zur Differenzierung des Tuberkelbacillus von den anderen säurefesten Stäbchen die Färbemethoden von Honsell, Weichselbaum, Bunge und Trantenroth und Marzinowsky.

Eigene Untersuchungen.

Zu meinen Versuchen benutzte ich:

1. vom Menschen stammende Tuberkelbacillen, und zwar
   a) frisch aus Reinkultur,
   b) getrocknet und durch Hitze abgetötet,
   c) aus tuberkulösen Veränderungen beim Meerschweinchen,
   d) avirulente (Klimmer);
2. vom Rinde stammende Tuberkelbacillen
   a) getrocknet und durch Hitze abgetötet,
   b) frisch aus Reinkultur;
3. vom Vogel stammende Tuberkelbacillen
   a) getrocknet und durch Hitze abgetötet,
   b) frisch aus Reinkultur,
   c) aus tuberkulösen Veränderungen beim Kaninchen;
4. vom Fisch stammende Tuberkelbacillen
   a) getrocknet und durch Hitze abgetötet,
   b) frisch aus Reinkultur;
5. von anderen säurefesten Bacillen, die außer den ersten fünf aus dem Laboratorium von Dr. Král in Prag bezogen wurden,

a) den Pseudoperlsuchtbacillus Moeller,
b) „ Bacillus Korn I (aus Butter),
c) „ „ Korn II (aus Butter),
d) „ Butterbacillus Rabinowitsch,
e) „ Milchbacillus Moeller,
f) „ Mistbacillus Moeller,
g) „ Timotheebacillus Moeller,
h) „ Smegmabacillus Moeller,
i) „ Blindschleichentuberkelbacillus Moeller,
k) „ Bacillus aus Harn Marpmann,
l) „ „ paratuberculosis Binot,
m) „ „ Karlinski (aus Nasenschleim),
n) „ „ Tobler I,
o) „ „ „ II,
p) „ „ „ III,
q) „ „ „ IV,
r) „ „ „ V.

Zunächst prüfte ich die Tuberkelbacillen allein in bezug auf ihre Färbbarkeit nach der **Gasis'schen Methode,** indem ich mich erst ganz genau an die Vorschrift hielt und erst dann, als es mir so nicht immer gelang, die Tuberkelbacillen in jedem Präparate als gutgefärbte und deutliche Stäbchen sichtbar zu machen, das Verfahren insofern ein wenig abänderte, als ich entweder intensiver mit Eosin färbte oder länger entfärbte und gegenfärbte. Die einzelnen Färbe- bez. Entfärbungszeiten wurden mittels Chronometer genau fixiert. Verwendet wurde zu diesen Versuchen eine möglichst dünne und gleichmäßige Emulsion aus einer Reinkultur von Menschentuberkelbacillen. Bei dieser Nachprüfung der Gasis'schen Methode mit Tuberkelbacillen-Reinkulturen konnte ich zunächst dessen Angaben im wesentlichen bestätigen. Bezüglich der Färbungszeit mit der Eosin-Sublimatlösung möchte ich jedoch noch erwähnen, daß eine 2 Minuten lange Einwirkung zumeist genügt,

während die Einwirkung der Farblösung 1 Minute hindurch sich im allgemeinen als etwas zu kurz erwies, indem die Tuberkelbacillen dann vielfach noch recht blaß waren. Die beste Färbung erzielte ich nach 3 Minuten langer Einwirkung. Was die Entfärbung anlangt, so entspricht der Vorschrift, entfärben, bis das Präparat an Stelle der roten eine weiß-grüne Farbe zeigt, wie ich ausprobiert habe, ungefähr eine Zeit von 30—40 Sekunden. Eine längere Einwirkung der Entfärbungsflüssigkeit dürfte indessen eine bessere Differenzierung der Tuberkelbacillen bedingen, während eine länger als verlangte Einwirkung der Methylenblaulösung die einzelnen Bacillen als rote Stäbchen auf blauem Untergrunde mitunter besser, mitunter schlechter in die Erscheinung treten läßt. Es zeigten sich die Tuberkelbacillen wohl am besten gefärbt, wenn die Eosinlösung 3 Minuten, die Entfärbungsflüssigkeit 30—40 Sekunden und die Methylenblaulösung 5—10 Sekunden einwirkten.

Nachdem es nun gelungen ist, die Tuberkelbacillen als deutlich gefärbte Stäbchen sichtbar zu machen, komme ich zu den eigentlichen Versuchen, nämlich zu ermitteln, wie sich die anderen, im Zusammenhang bereits aufgeführten, säurefesten Bakterien (Korn-, Smegma-, Pseudoperlsucht-, Gras-, Mist-Bacillus etc.) der Differentialfärbemethode von Gasis gegenüber verhalten, vor allem zu sehen, ob sie sich mit Hilfe dieses Verfahrens von dem Tuberkelbacillus unterscheiden lassen, indem sie im Gegensatz zu dem Erreger der Tuberkulose nicht alkalifest, also nicht rot gefärbt, sondern entfärbt sind, bez. die blaue Kontrastfarbe angenommen haben.

Um eine untereinander möglichst gleichmäßige Färbung und Entfärbung der Tuberkelbacillen und der untersuchten säurefesten Bacillen zu ermöglichen, traf ich folgende Versuchsordnung: Alle jeweilig zur Färbung verwendeten

säurefesten Bakterien wurden auf einen Objektträger aufgestrichen, indem ich denselben in der Anzahl der benutzten Bakterienarten entsprechende Karrees einteilte. Ich glaubte, auf diese Weise besser das tinktorielle Verhalten der betreffenden Mikroorganismen der zu prüfenden Färbemethode gegenüber beurteilen bez. vergleichen zu können. Zu diesen Versuchen wurden dünne, gleichmäßige Emulsionen aus Reinkulturen der zu untersuchenden Bacillen verwendet, die vorher immer frisch hergestellt wurden. Ebenso wurden die Farbflüssigkeiten und die Entfärbungsflüssigkeit öfter erneuert, um eine Verunreinigung der Präparate durch Farbstoffniederschläge und eine Verringerung der Entfärbungsintensität zu verhindern. Neben den säurefesten Bakterien wurden auch zwecks Kontrolle der Färbung nicht säurefeste Bacillen mit benutzt, so Bacillus mesentericus, Diplococcus intracellularis equi Johne, Staphylococcus pyogenes aureus et albus. Auch bei diesen Versuchen hielt ich mich zunächst ganz genau an die Vorschrift und änderte dann, als es mir auf diese Weise nicht hinlänglich gelang, eine vollständige Differenzierung des Tuberkelbacillus von den anderen säurefesten Stäbchen zu erreichen, die Gasis'sche Methode wieder insofern ab, als ich länger mit Eosinlösung färbte oder länger entfärbte und gegenfärbte bei gleicher Einwirkungsdauer der Eosinlösung. Auch änderte ich die Entfärbungsflüssigkeit der Gasis'schen Methode, und zwar insofern, als ich die beiden Bestandteile derselben in ihren Dosen vertauschte, d. h. an Stelle von 0,5 g Natriumhydrat 1,0 g und anstatt 1,0 g Kaliumjodid 0,5 g nahm. Ich hoffte, auf diese Weise durch den höheren Gehalt der Entfärbungsflüssigkeit an Natronlauge eine bessere tinktorielle Differenzierung zu erreichen. Schließlich verwendete ich, da auch mit dieser Abänderung das Verfahren meinen Erwartungen, in jedem Falle eine durchgreifende Differenzierung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Stäbchen zu

gestatten, nicht entsprach, eine andere Farbflüssigkeit an Stelle der Eosinlösung; die Entfärbung nahm ich dabei sowohl mit der in der Gasis'schen Methode vorgeschriebenen als auch mit der in oben angeführter Weise durch Vertauschen der Dosen der Gasis'schen Entfärbungsflüssigkeit gewonnenen Flüssigkeit vor.

Was nun zunächst die Färbung der Tuberkelbacillen und der anderen, zur Untersuchung verwendeten säurefesten Bakterien nach der Gasis'schen Methode sowohl nach Vorschrift als auch unter Abänderung der Färbungs- und Entfärbungszeiten anlangt, so kann ich auf Grund meiner zahlreichen diesbezüglichen Versuche konstatieren, daß eine vollständige Differenzierung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Stäbchen, wenn ich genau nach Vorschrift färbte, im allgemeinen nicht möglich war; denn einerseits waren die Tuberkelbacillen vielfach nicht intensiv genug gefärbt und als Stäbchen erkennbar, sie zeigten vielmehr sehr oft eine blaßrote Farbe und waren manchmal ganz entfärbt; andererseits ließen die Präparate der anderen säurefesten Bacillen mitunter noch rote, bez. violettrote Stäbchen oder wenigstens rote Stellen erkennen. Allerdings muß zugegeben werden, daß, nach Vorschrift gefärbt, gewisse geringfügige tinktorielle, praktisch aber nicht verwendbare Unterschiede schon vorhanden waren, indem die geprüften säurefesten Saprophyten zum größten Teil (ca. 80 Prozent) entfärbt waren resp. die blaue Kontrastfarbe angenommen hatten, während die nicht entfärbten Bacillen meist blasser als der Tuberkelbacillus gefärbt waren. Einige Male ist es mir gelungen, mit der Gasis'schen Methode, genau nach Vorschrift gefärbt, eine vollständige Differenzierung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Bacillen herbeizuführen. Doch waren in einigen dieser Fälle die Tuberkelbacillen schwach gefärbt und verhältnismäßig schlecht als rote Stäbchen erkennbar. Daß nach der Gasis'schen Methode keine

konstanten, gleichmäßigen Ergebnisse erzielt wurden, mag vor allem wohl daran liegen, daß die Färbungsintensität der Eosin-Sublimatlösung nach den jeweiligen, variablen, äußeren Bedingungen nicht unerheblichen Schwankungen unterliegt. Aenderte ich nun die Färbungs- und Entfärbungszeiten der Gasis'schen Methode, so fand ich, daß die tinktorielle Differenzierung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Stäbchen am besten war, wenn ich die Entfärbungsflüssigkeit so lange einwirken ließ, bis das Präparat nach der Alkohol- und Wasserbehandlung keine rote Farbe mehr zeigte, sondern nahezu farblos geworden war. Es entsprach das in den meisten Fällen ungefähr der doppelten Einwirkungszeit der Farblösung. Doch war auch auf diese Weise nicht immer eine vollkommene Differenzierung zu ermöglichen. Es machte sich deshalb nötig, die Entfärbungsflüssigkeit noch länger einwirken zu lassen, mit dem Nachteil allerdings, daß dadurch auch die Tuberkelbacillen teilweise an Intensität der Färbung verlieren oder sogar zu einem nicht geringen Teil entfärbt werden.

Auch durch Aenderung des Entfärbungsmittels, indem ich die Bestandteile desselben in ihren Dosen vertauschte, konnte ich, wenn auch öfter, so doch nicht immer, eine Differenzierung in der Färbbarkeit zwischen den Tuberkelbacillen und den anderen säurefesten Bakterien herbeiführen, ein Beweis, daß durch den erhöhten Gehalt des Entfärbungsmittels an Natronlauge eine bessere Entfärbung und schließlich auch eine bessere tinktorielle Differenzierung erreicht werden kann. Indessen besteht auch hier wieder die Gefahr, daß außer den säurefesten Saprophyten auch ein Teil der Tuberkelbacillen bei einer gewissen Entfärbungsdauer die rote Farbe ganz oder wenigstens teilweise verliert.

Auf Grund meiner zahlreichen Versuche, die Tuberkelbacillen mit Hilfe der Gasis'schen Färbemethode von den

anderen säurefesten Bakterien zu differenzieren, kann ich feststellen, daß einzelne tuberkelbacillenähnliche Bakterien auch gegen alkalische Entfärbungsmittel bei Anwendung von Eosin als Farbflüssigkeit sehr widerstandsfähig sind, wenn ich auch sagen kann, daß die Tuberkelbacillen im großen und ganzen die alkalische Entfärbungsflüssigkeit länger vertragen. Die tuberkelbacillenähnlichen Bakterien vertrugen nicht selten eine Einwirkungsdauer der Entfärbungsflüssigkeit von 15 Minuten, beginnen aber von da an sich vollkommen zu entfärben, während die Tuberkelbacillen das alkalische Entfärbungsmittel häufig 20 Minuten vertragen, ohne dabei groß an Intensität der Rotfärbung gelitten zu haben. Indessen konnte ich in vielen der angefertigten Präparate auch beobachten, daß die Tuberkelbacillen schon nach 5 Minuten Entfärbung anfingen, zu erblassen oder teilweise bereits entfärbt waren, während auf der anderen Seite diese Entfärbungszeit meist noch nicht genügte, um eine vollständige Entfärbung aller anderen säurefesten Bacillen herbeizuführen. Es erscheinen also auch bezüglich der Alkalifestigkeit wie bei der Säurefestigkeit keine prinzipiellen, sondern oft nur graduelle färberische Unterschiede der Tuberkelbacillen einerseits und der tuberkelbacillenähnlichen Bakterien andererseits zu bestehen, wenn auch im großen und ganzen die Tuberkelbacillen alkalifester sind als die ihnen verwandten Mikroorganismen. Auch nahm ich bei Nachprüfung der Gasis'schen Methode wahr, daß wie bei den auf der Säurefestigkeit beruhenden Differentialfärbeverfahren die Tuberkelbacillen sich mehr gleichmäßig entfärbten, während die anderen säurefesten Bakterien im allgemeinen ein mehr sprungweises Erblassen zeigten.

Ueber die Resultate meiner Untersuchungen, zu denen ich außer den erwähnten Saprophyten vergleichsweise Tuberkelbacillen

1. vom Menschen (avirulent, abgetötet und aus tuberkulösen Veränderungen beim Meerschweinchen),
2. vom Rinde (abgetötet und frisch aus Kultur),
3. vom Vogel (abgetötet, frisch aus Kultur und aus tuberkulösen Veränderungen beim Hasen),
4. vom Fisch (abgetötet und frisch aus Reinkultur)

benutzte, möge folgende tabellarische Zusammenstellung Aufschluß geben.

Tabelle.

Nr. d. Pr.	Einwirkungszeit der Eosinlösung	Einwirkungszeit der Entfärbungsflüssigkeit	Einwirkungszeit der Methylenblaulösung	Resultat
1	2′	12′	3″	**Tb. hom.** †, verhältnismäßig gut gefärbte, teilweise blasse und granulierte rote Stäbchen. **Smegma-B.**, keine roten Stäbchen. **Tb. bov.** †, verhältnism. gut gefärbte, teilw. granul. rote Stäbchen, teilweise entfärbt. **B. Marpmann**, rote, gut differenzierte, teilweise granul. Stäbchen; blaue Stäbchen. **B. Karlinski**, keine roten Stäbchen. **B. Korn II**, „ „ „ **B. Binot**, „ „ „ **Timothee-B.**, „ „ „ **B. Tobler I**, blaue u. einzelne verhältnism. gut gefärbte rote Stäbchen. **B. Tobler II**, keine roten Stäbchen. **B. Tobler III**, „ „ „ **Milchbacillus Möller**, blaue u. einzelne rote Stäbchen.

2	2′	12′	3″	**Tb. hom.** †, verhältnism. gut gefärbte teilw. granul. rote Stäbchen, teilw. entfärbt. **Smegma-B.**, fast nur blaue Stäbchen. **Tb. bov** †, verhältnism. gut gefärbte rote Stäbchen, teilw. entfärbt bez. blau gefärbt. **B. Korn II**, nur blaue Stäbchen. **B. Pseudo-Perlsucht**, nur blaue Stäbchen. **Mist-B.**, „ „ „ **Butterbac. Rabinowitsch**, blaue u. einz. rote Stäbchen. **Milchbacillus Möller**, nur blaue Stäbchen. **Timotheebacillus**, „ „ „ **B. Marpmann**, „ „ „ **B. Tobler IV**, „ „ „ **B. Tobler V**, „ „ „ **B. Korn I**, fast nur blaue, ganz wenig blaßrote Stäb. **B. Karlinski**, nur blaue Stäbchen.
3	2′	13′	3″	**Tb. avis** (vom Kaninchen) verhältnism. schwach gefärbte rote Stäbchen, teilweise entfärbt. **Smegma-B.**, nur blaue Stäbchen. **Tb. hom.**, **Tb. bovis**, Kultur: mitunter schwach gefärbte rote Stäbchen; z. gr. Teil entfärbt. ungleichmäßig rot gefärbte Stäbchen; z. T. entfärbt. **Tb. piscis**, fast vollkommen entfärbt; einzelne blaßrote Stäbchen. **Tb. Blindschleiche**, fast vollkommen entfärbt; einzelne blaßrote Stäbchen. **B. Korn I**, fast nur blaue Stäbchen. **B. Pseudo-Perlsucht**, nur blaue Stäbchen. **Mistbacillus**, „ „ „ **Butterbacillus Rabinowitsch**, nur blaue Stäbchen. **Milchbacillus Möller**, fast nur blaue Stäbchen. **Tb. avis** (Kult.) verh. gut gef. rote Stäbchen, teilw. entf. **Tb. avis** †, „ „ „ „ „ „ „ **Tb. avirul.** „ „ „ „ „ „ „

Bezüglich des färberischen Verhaltens sämtlicher mir zur Verfügung stehenden säurefesten Saprophyten untereinander und den Tuberkelbacillen gegenüber kann ich konstatieren, und geht das auch teilweise aus obiger Tabelle hervor, daß nach der Gasis'schen Methode zwischen den einzelnen säurefesten Saprophyten keine prinzipiellen, sondern nur graduelle Unterschiede mitunter feinster Art existieren, die oft ganz übersehen werden können, jedenfalls eine Differenzierung der säurefesten Saprophyten untereinander unmöglich gestatten. Was die färberische Unterscheidung

aller dieser Bacillen von den Tuberkelbacillen nach dem Gasis-schen Verfahren anlangt, so habe ich im allgemeinen darüber bereits früher gesprochen, besonders, daß die Tuberkelbacillen der alkalischen Entfärbungsflüssigkeit im großen und ganzen länger Widerstand leisten als die anderen säurefesten Bakterien. Doch erwiesen sich auch, wie ich gleichfalls schon dargelegt habe, die tuberkelbacillenähnlichen Mikroorganismen als ziemlich alkalifest. Besonders widerstandsfähig dem alkalischen Entfärbungsmittel gegenüber waren, wie ich bei meinen diesbezüglichen vergleichenden Untersuchungen konstatieren konnte, der Butterbacillus, der Moellersche Milchbacillus, der Bacillus Korn I, der Bacillus Tobler I und der Bacillus Marpmann, während sich die anderen säurefesten tuberkelbacillenähnlichen Bakterien im allgemeinen als etwas weniger alkalifest erwiesen. Indessen bestehen in dieser Hinsicht nur graduelle, keine prinzipiellen Unterschiede, wie ich das schon betont habe.

Was nun die Färbung der Tuberkelbacillen nach dem Gasis'schen Verfahren anlangt, so kann ich im großen und ganzen die Angaben des Verfassers dieser Methode und die Resultate Bergers[12]), der das Verfahren nur an Tuberkelbacillen nachgeprüft hat, bestätigen. Man kann mit dieser Methode recht klare Bilder erhalten, indem die rot gefärbten Tuberkelbacillen sich deutlich von dem blau-grünen Untergrund abheben. Die Tuberkelbacillen ließen mit der Gasis-schen Färbung sehr oft eine gekörnte Struktur erkennen und traten die dunkler gefärbten Körnchen in dem rosaroten Bacillenleib deutlich hervor. Bezüglich des Verhaltens der einzelnen Tuberkelbacillenarten (vom Menschen, Rind, Vogel, Fisch) der Gasis'schen Färbemethode gegenüber ist zu erwähnen, daß sich färberische Unterschiede im allgemeinen so gut wie nicht feststellen ließen, sondern es zeigten sich alle diese Arten fast gleich intensiv rot gefärbt. Nur die Fischtuberkelbacillen waren durchschnittlich etwas blasser

rot gefärbt und bei einer verhältnismäßig langen Einwirkungszeit des alkalischen Entfärbungsmittels zu einem beträchtlicheren Teile entfärbt als die anderen Tuberkelbacillen. Meiner Meinung nach scheinen die Fischtuberkelbacillen und, wie ich gefunden habe, auch der Blindschleichentuberkelbacillus in der Alkalifestigkeit eine Mittelstufe zwischen dem Erreger der menschlichen, Säugetier- und Vogeltuberkulose einerseits und den übrigen, zur Untersuchung verwendeten säurefesten Bakterien andererseits einzunehmen. Auch konnte ich nach der Gasis'schen Färbemethode einen, wenn auch nicht durchgreifenden Unterschied zwischen abgetöteten und avirulenten Menschentuberkelbacillen feststellen, indem die abgetöteten sich im großen und ganzen intensiver färbten als die durch Molchpassage avirulent gewordenen, die ihrerseits wieder intensiver gefärbt waren als die Vogel- und Kaltblütertuberkelbacillen, sowie säurefesten Saprophyten. Die als Kontrolle zur Untersuchung mit verwendeten, nicht säurefesten Bakterien waren durch Annahme der Kontrastfarbe immer deutlich blau gefärbt.

Ich versuchte nun, das Eosin in der Gasis'schen Methode durch einen anderen Farbstoff zu ersetzen. Zu diesem Zwecke wurden auf ihre Färbbarkeit den Tuberkelbacillen gegenüber folgende einprozentige Farblösungen probiert, die, bei Nichtlöslichkeit in destilliertem Wasser, zur Hälfte mit 95 prozentigem Alkohol verdünnt wurden: Säurefuchsin, Kongorot, Orange G, Pikrinsäure, Tropaeolin ^{00}, Rosolsäure. Es wurden mit jeder dieser Farbflüssigkeiten je neun Präparate behandelt. Drei von den neun Präparaten wurden innerhalb fünf Minuten dreimal aufgekocht, drei eine halbe Stunde in den Brutofen gestellt, und die letzten drei wurden fünf Minuten bei Zimmertemperatur (20° C) gehalten. Das erste jedes dieser drei Präparate wurde in Wasser, das zweite in Natronlauge (0,5 %) und das dritte in Schwefelsäure (0,5 %) abgespült. Es zeigte sich, daß

Säurefuchsin am besten von diesen Flüssigkeiten zur Färbung der Tuberkelbacillen geeignet war. Ich benutzte deshalb an Stelle des Eosins das Säurefuchsin und wendete als Beizen für diesen Farbstoff Calomel und auch Sublimat an. Ersteres erwies sich als geeigneter, da es trotz geringerer Beizwirkung in Verbindung mit Säurefuchsin weniger Farbstoffniederschläge bildet. Andere Substanzen (Phenollösung 5 %, Schwefelsäure 1 %, 3 % und 5 %, Kupfersulfatlösung 1 % und 5 %, Eisenchloridlösung 1 % und 5 %, Seifenlösung 1 % und 10 %, absoluter Alkohol, Ligroin, Chloroform, Benzoylchlorid waren als Beizen für Säurefuchsinlösung ungeeignet. Zur Entfärbung der mit Säurefuchsin behandelten Präparate benutzte ich, indem ich die von Gasis entdeckte neue Reaktion der Tuberkelbacillen, die Alkalifestigkeit, weiter verwendete, sowohl die von Gasis vorgeschriebene, als auch die durch Vertauschen der Dosen der Bestandteile derselben in der erwähnten Weise abgeleitete Entfärbungsflüssigkeit. Die Gegenfärbung nahm ich mit der in der Gasis'schen Methode vorgeschriebenen einprozentigen Methylenblaulösung vor. Die zur Färbung verwendete einprozentige Säurefuchsinlösung war in analoger Weise wie die Gasis'sche Eosinlösung hergestellt (1 g Säurefuchsin, 5 ccm absoluter Alkohol, 95 ccm destilliertes Wasser).

Das Färbeverfahren, mit dem ich nun eine färberische Unterscheidung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Bakterien herbeizuführen versuchte, ist also, noch einmal zusammengefaßt, folgendes:

1. Einige ccm (ca. 5 ccm) der oben beschriebenen einprozentigen Säurefuchsinlösung werden mit einem ungefähr linsengroßen Stück Calomel bez. Sublimat versetzt und im Reagensglas langsam und vorsichtig unter Umschütteln gekocht, bis sich das Calomel bez. das Sublimat soweit als möglich auflöst. Mit dieser warmen Farblösung wird das fixierte Ausstrichpräparat bedeckt, dann

2. in Wasser abgespült, und

3. mit dem Gasis'schen bez. dem daraus abgeleiteten Entfärbungsmittel behandelt.

4. Entfernung der alkalischen Entfärbungsflüssigkeit durch absoluten Alkohol.

5. Gründliches Abspülen des Präparates in Wasser.

6. Kontrastfärbung mit einprozentiger Methylenblaulösung (1 g krist. Methylenblau, 10 ccm absoluter Alkohol, $^1/_2$ ccm Salzsäure, 90 ccm destilliertes Wasser).

7. Abspülen etc.

Die Versuchsanordnung war hierbei wieder dieselbe wie bei dem Gasis'schen Verfahren, indem alle zur Färbung benutzten säurefesten Bakterienarten, soweit sich das ermöglichen ließ, auf einen Objektträger aufgestrichen wurden. Um eine möglichst intensive Rotfärbung der Tuberkelbacillen und eine vollständige Entfärbung bez. Blaufärbung der anderen säurefesten Bacillen zu erzielen, ließ ich die Farb- und die Entfärbungsflüssigkeit verschieden lange einwirken und fixierte die einzelnen Zeiten genau. Zunächst färbte ich eine Minute mit Säurefuchsinlösung und steigerte dann mehr und mehr, indem ich jedes folgende Präparat $^1/_2$—1 Minute länger mit der einprozentigen Farblösung behandelte. Einige Male ließ ich das Färbungsmittel sogar mehrere Stunden einwirken. In gleicher Weise variierte ich auch die Entfärbungzeit, indem ich dieselbe von nur wenigen Sekunden bis auf mehrere Minuten ausdehnte. Die Kontrastfarbe ließ ich immer nur drei Sekunden einwirken, und hielt ich diese Zeit auch für ausreichend.

Was nun die Resultate meiner diesbezüglichen zahlreichen Versuche, mit Hilfe des eben gegebenen Verfahrens, die Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Bakterien zu differenzieren, anlangt, so sind dieselben oft ziemlich günstige gewesen. Vor allem konnte ich feststellen, daß in jedem der von mir auf diese Weise angefertigten Präparate die säurefesten, tuberkelbacillenähnlichen Bakterien sämtlich schön blau gefärbt waren, ohne daß im Gesichtsfelde auch nur ein rotes Stäbchen wahrgenommen werden konnte,

während die Tuberkelbacillen als blaßrote, mitunter verhältnismäßig gut gefärbte und deutlich erkennbare rote Stäbchen in die Erscheinung traten. Vollkommen günstig waren die Resultate deswegen nicht, weil die Tuberkelbacillen einerseits mitunter noch recht blaß gefärbt waren, andererseits sich bereits gleich den anderen säurefesten Bakterien entfärbt resp. die blaue Kontrastfarbe etwas angenommen hatten. In gewissen Grenzen ließ sich zwar die Intensität der Rotfärbung der Tuberkelbacillen durch eine längere Einwirkung der Säurefuchsinlösung steigern. Doch gehört, wie ich beobachten konnte, zu einer bestimmten Färbungsdauer der Säurefuchsinlösung auch eine entsprechende Entfärbungszeit der alkalischen Flüssigkeit, und dadurch ist wiederum die Möglichkeit gegeben, daß die Tuberkelbacillen an Intensität der Rotfärbung verlieren oder sich teilweise ganz entfärben. Bei Wiederholung meiner diesbezüglichen Versuche mit frisch bezogenem Säurefuchsin erhielt ich indessen nur negative Resultate, indem nicht nur die tuberkelbacillenähnlichen Bakterien sich vollkommen entfärbt hatten, sondern auch die Tuberkelbacillen so gut wie keine roten Stäbchen mehr zeigten.

Was nun die Empfindlichkeit der Tuberkelbacillen und der zur Untersuchung verwendeten anderen säurefesten Bakterien dem alkalischen Entfärbungsmittel gegenüber nach Färbung mit Säurefuchsinlösung anbetrifft, so konnte ich beobachten, daß die Tuberkelbacillen sich im allgemeinen verhältnismäßig resistent verhielten und oft eine Einwirkungsdauer desselben von 20 Minuten noch gut vertrugen. Die tuberkelbacillenähnlichen Bakterien dagegen waren wenig widerstandsfähig und mitunter schon in ganz wenig Sekunden total entfärbt.

Die geschilderten Resultate, die mit der Säurefuchsinfärbung erzielt wurden, blieben im großen und ganzen auch dieselben, wenn ich als Beize Sublimat anstatt Calomel und

an Stelle der Gasis'schen Entfärbungsflüssigkeit die daraus durch Vertauschen der Bestandteile in ihren Dosen abgeleitete Flüssigkeit zur Entfärbung verwendete. Die mit Sublimat gebeizten Tuberkelbacillen-Präparate waren höchstens etwas blasser rot gefärbt und zeigten eher Farbstoffniederschläge. Ebenso scheint durch die in der erwähnten Weise abgeänderte Entfärbungsflüssigkeit, und zwar durch den erhöhten Gehalt derselben an Natronlauge, die Intensität der Entfärbung zuzunehmen und dadurch die Rotfärbung der Tuberkelbacillen etwas verringert zu werden. Wie bei der Gasis'schen Methode, fand ich auch bei diesem Verfahren, daß die abgetöteten Tuberkelbacillen sich intensiver rot färbten als die avirulenten, diese wiederum etwas intensiver als die Vogel- und Kaltblütertuberkelbacillen, während die zu den Versuchen verwendeten tuberkelbacillenähnlichen Stäbchen ungefähr gleich intensiv blau gefärbt waren.

Wenn ich nun die Ergebnisse meiner Versuche, auf Grund der Alkalifestigkeit mit der Färbemethode von Gasis und dem von mir daraus abgeleiteten Verfahren, indem ich die einprozentige Eosinlösung durch eine einprozentige Säurefuchsinlösung analoger Zusammensetzung ersetzte, eine vollkommene färberische Unterscheidung des Tuberkelbacillus von den anderen säurefesten Bakterien herbeizuführen, zusammenfasse, so möchte ich bezüglich der Gasis'schen Differentialfärbemethode folgendes feststellen:

1. Mit diesem Verfahren war eine vollkommene Differenzierung mitunter, aber nicht immer möglich.
2. Die tuberkelbacillenähnlichen säurefesten Bakterien waren oft bei einer Einwirkungsdauer der alkalischen Entfärbungsflüssigkeit von 15 Minuten noch rot gefärbt.
3. Die Tuberkelbacillen vertragen zwar die Entfärbungsflüssigkeit im allgemeinen länger als die ihnen ver-

wandten Mikroorganismen, einige Bacillen entfärbten sich aber schon nach fünf Minuten bei zwei Minuten Eosinfärbung.

Denkt man sich nun diese Methode in der Praxis angewendet, z. B. zum Nachweis von Tuberkelbacillen in Sputum, Urin oder auch in Milch, so könnten nach meinen Ergebnissen, falls mit dem Verfahren rote Stäbchen gefunden werden, diese Bacillen gerade nicht entfärbte, säurefeste Saprophyten sein. Werden jedoch kiene roten Bacillen in dem betreffenden Untersuchungsmaterial mit der Gasis'schen Methode gefunden, dann wäre es nach meinen Resultaten immerhin noch möglich, daß Tuberkelbacillen zwar vorhanden sind, aber durch die alkalische Entfärbungsflüssigkeit entfärbt worden sind.

Wenn ich mir also ein Urteil über die Gasis'sche Färbung erlauben darf, so geht dasselbe kurz dahin, daß die Methode als Differentialfärbeverfahren vorläufig nur ein wissenschaftliches, aber noch kein praktisches Interesse besitzt, und ich stimme mit Berger überein, daß die Gasissche Färbemethode außerdem gewisse Schwierigkeiten in der Ausführung bietet, die an und für sich schon einen Verlust von Tuberkelbacillen bedingen können. Einen Ersatz für die einfache und gebräuchliche Ziehl-Methode dürfte das Verfahren deswegen nicht darstellen, trotz der schönen und klaren Bilder, die man mit ihm erhalten kann.

Was das aus der Gasis'schen Methode abgeleitete Verfahren hingegen anlangt (Färbung mit einprozentiger Säurefuchsinlösung etc.), so waren mit ihm die tuberkelbacillenähnlichen Bakterien bereits nach kurzer Zeit entfärbt bez. blau gefärbt, und zwar vollständig, während die Tuberkelbacillen oft als verhältnismäßig gut gefärbte rote Stäbchen in die Erscheinung traten. Mitunter waren die Tuberkelbacillen auch recht blaß gefärbt, teilweise sogar entfärbt. Einige Male zeigten sich gar keine roten Stäbchen mehr.

Zum Schluß möchte ich noch erwähnen, daß ich mit den Färbemethoden von Honsell, Weichselbaum, Bunge und Trantenroth und Marzinowsky, die auf der Säurefestigkeit beruhen und die ich zur Differenzierung der Tuberkelbacillen von den anderen säurefesten Stäbchen verwendete, nur negative Resultate erzielt habe. Besonders ungünstig waren vor allem die Ergebnisse nach Honsell, Weichselbaum, Bunge und Trantenroth, indem die Präparate der säurefesten Saprophyten beinahe zur größeren Hälfte noch rote Stäbchen zeigten, die fast ebenso intensiv gefärbt waren wie die Tuberkelbacillen. Etwas günstiger waren die Resultate mit dem Färbeverfahren von Marzinowsky insofern, als ich beobachten konnte, daß die Menschentuberkelbacillen sich im großen und ganzen so gut wie nicht mit dem kalten Carbolfuchsin gefärbt hatten, während die säurefesten Saprophyten und auch die Vogeltuberkelbacillen sich als intensiv rot gefärbte Stäbchen repräsentierten. Doch zeigten auch die Präparate der Menschentuberkelbacillen fast immer noch einzelne verhältnismäßig intensiv rot gefärbte Stäbchen. Ich bin deshalb der Meinung, daß sich die Methoden von Honsell, Weichselbaum, Marzinowsky, Bunge und Trantenroth zu einer färberischen Unterscheidung des Tuberkelbacillus von den säurefesten Stäbchen nicht eignen.

Zusammenfassung:

1. Die Tuberkelbacillen unterscheiden sich von den meisten anderen Bakterien nicht nur durch ihre bekannte Säurefestigkeit, sondern auch, wie dies Gasis zuerst gezeigt hat, durch ihre Alkalifestigkeit.

2. Diese Alkalifestigkeit kann man nach den Angaben von Gasis zur Darstellung bringen, wenn man die Tuberkelbacillen 1—2 Minuten lang mit einer einprozentigen Eosinlösung, welche durch Sublimat in Schwebefällung gebracht worden ist, anfärbt und mit einer 0,5 prozentigen Natrium-

hydratlösung in 50 prozentigem Alkohol, welcher 1 Prozent Kaliumjodid enthält, kurze Zeit nachbehandelt. Unter diesen Verhältnissen erscheinen die Tuberkelbacillen rot gefärbt, während die meisten anderen Bakterien durch die alkalische Entfärbungsflüssigkeit entfärbt bez. bei Nachfärben mit einer leicht angesäuerten Methylenblaulösung blau gefärbt sind.

3. Um eine deutliche Färbung der Tuberkelbacillen herbeizuführen, ist es besser, die Eosin-Sublimatlösung etwas länger, als Gasis angibt, nämlich 3 Minuten lang einwirken zu lassen.

4. Als die günstigste Einwirkungsdauer der Entfärbungsflüssigkeit hat sich im allgemeinen eine Zeit von 30 bis 40 Sekunden bewährt.

5. Die in der angegebenen Weise vorbehandelten Präparate sind nach Gasis auf 2 bis 3 Sekunden einer Kontrastfärbung mit einer leicht angesäuerten Methylenblaulösung zu unterwerfen. Nach meinen Erfahrungen erscheint es zweckmäßig, die Kontrastfarbe 5 bis 10 Sek. einwirken zu lassen.

6. An Stelle des Eosins kann man zur Färbung der Tuberkelbacillen auch andere saure Anilinfarben benutzen.

7. Unter den sauren Anilinfarben hat sich zur Färbung der Tuberkelbacillen namentlich das Säurefuchsin bewährt, welches mindestens ebenso gute Färbung der Tuberkelbacillen ermöglicht wie das Eosin.

8. Zur Färbung der Tuberkelbacillen eigneten sich dagegen Kongorot, Tropaeolin ^{00}, Orange G, Rosolsäure und Pikrinsäure nicht.

9. Zur Verstärkung der Farbwirkung der sauren Anilinfarben wurde neben dem Sublimat noch eine Reihe anderer chemischer Stoffe versucht; von diesen bewährte sich Calomel recht gut, Ameisensäure gut und fünfprozentige Phenollösung, ein-, drei- und fünfprozentige Schwefelsäure, ein- und fünfprozentige Kupfersulfatlösung, ein- und fünfprozentige Eisenchloridlösung, ein- und zehnprozentige Seifenlösung,

Oelsäure, absoluter Alkohol, Ligroin, Chloroform und Benzoylchlorid nicht.

10. Nach meinen Versuchen erscheint es zweckmäßig, den Gehalt der Entfärbungsflüssigkeit von nach Gasis 0,5% Natriumhydrat auf 1% zu erhöhen.

11. Sowohl nach der Gasis'schen Methode als auch den in der angegebenen Weise modifizierten Verfahren lassen sich klare Bilder erhalten, in denen die rot gefärbten Tuberkelbacillen sich deutlich von dem blaugrünen Untergrund abheben.

12. Die Tuberkelbacillen zeigen auch nach diesem Verfahren oft eine gekörnte Struktur, indem dunkler gefärbte Körnchen in dem rosaroten Bacillenleib deutlich hervortreten.

13. Die Alkalifestigkeit ist nicht nur dem Tuberkelbacillus des Menschen, der Säugetiere und Vögel, sondern auch der Kaltblüter und den säurefesten Saprophyten eigentümlich.

14. Zwischen der Alkalifestigkeit der einzelnen vom Menschen, Rind, Vogel und Kaltblüter herrührenden Tuberkelbacillenstämme lassen sich prinzipielle färberische Unterschiede nicht feststellen. Es bestehen in dieser Richtung nur geringfügige graduelle, auch nicht immer hinlänglich deutlich hervortretende Unterschiede, die zur sicheren Trennung praktisch nicht verwertbar sind. Versucht man dennoch eine Gruppierung dieser Stämme vorzunehmen, so würden sie mit abnehmender Alkalifestigkeit, wie folgt, einzureihen sein: Menschen- und Rindertuberkelbacillen, avirulente Tuberkelbacillen, Vogeltuberkelbacillen, Blindschleichen- und Fischtuberkelbacillen.

15. Auch zwischen der Alkalifestigkeit der verschiedenen Tuberkelbacillenstämme und der säurefesten Saprophyten bestehen keine prinzipiellen, sondern nur graduelle Unterschiede, welche zwar zuweilen, namentlich bei Verwendung von Säurefuchsin und Calomel, als Farbflüssigkeit zur Dar-

stellung gebracht werden konnten, aber dennoch zur alleinigen Unterscheidung beider Gruppen praktisch nicht zu verwenden sind.

16. Die Alkalifestigkeit der säurefesten Saprophyten unterliegt gleich ihrer Säurefestigkeit je nach den einzelnen Arten Schwankungen. Während einige Arten, so der säurefeste Bacillus Binots, Karlinskis, Korns (II), Toblers (II, IV, V), sowie der Timothee-Pseudoperlsucht- und Mistbacillus Moellers zumeist sich als etwas weniger alkalifest erwiesen, zeigten andere (säurefester Bacillus Marpmanns, Korns (I), Toblers (I), Butter- und Milchbacillus) in der Regel eine etwas größere Alkalifestigkeit.

17. Auf die Alkalifestigkeit hat unter anderem auch das Alter der Bacillen einen Einfluß, und zwar derart, daß junge Bacillen weniger alkalifest sind als ältere.

18. Auf Grund der Alkalifestigkeit können die einzelnen Tuberkelbacillenstämme weder untereinander noch von den säurefesten Saprophyten mit hinlänglicher Sicherheit getrennt werden.

19. Auch die auf der Säurefestigkeit beruhenden Methoden, so die von mir geprüften Verfahren von Honsell, Weichselbaum, Bunge und Trantenroth und Marzinowsky, liefern zur Trennung der Tuberkelbacillen von den säurefesten Saprophyten praktisch keine hinlänglich eindeutigen und sicheren Ergebnisse.

Es ist mir noch eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Klimmer, unter dessen Leitung ich mich dieser Arbeit unterzogen habe, für die Anregungen und Ratschläge, mit denen er mich unterstützte, sowie für das meiner Arbeit entgegengebrachte rege Interesse meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Literatur-Verzeichnis.

1. **Abbott and Gildersleeve**: The etiological significance of the acid-resisting group of bacteria and the evidence in favor of their botanical relation to bacillus tuberculosis. (Univers. of Pennsylvania Med. Bull., Philadelphia, June. Ref: Baumg. Jahresb. 1902, S. 529.)
2. **Alvarez et Tavel**: Recherches sur le bacille de Lustgarten. (Arch. de Phys. norm. et path., 1885, Nr. 7, S. 303.)
3. **De Angelis**: Einfache und sichere Färbemethode für Tuberkelbacillen des Rindes (Ref: Ellenberger-Schütz, Jahresb. 1902, S. 51).
4. **Arens**: Ein einfacher Nachweis von Tuberkelbacillen durch Färbung nebst einer Angabe zur Färbung von Bakterien in fettreichen Substraten. (Ctbl. f. Bact., Parasitenk. und Infektionskr. 1892, Bd. 11, Nr. 1, S. 9.)
5. **Arloing**: Unité de la tuberculose humaine et de la tuberculose bovine. (Presse médicale 1902, Nr. 13. Ref: Zeitschr. für Tub. und Heilstättenw., Bd. 3, S. 450.)
6. **Aujeszky**: Ueber die Bedeutung der säurefesten, tuberkelbacillenähnlichen Stäbchen bei der Beurteilung der Untersuchungen auf Tuberkulose. (Ref: Baumg. Jahresb. 1905, S. 564.)
7. **Bang, O.**: Geflügeltuberkulose und Säugetiertuberkulose. (Ctbl. f. Bact. etc., 1. Abt. Orig. Bd. 46, Hft. 6, 1908, S. 461.)
8. **Bataillon, Dubard et Terre**: Un nouveau type de tuberculose (Comptes rendus biol., 1897, p. 44.)
9. **Bataillon, A. Moeller, Terre**: Ueber die Identität des Bacillus des Karpfens und des Bacillus der Blindschleiche (Zeitschr. f. Tub. und Heilst., 1902, Bd. 3, Hft. 6, S. 467.)
10. **Baumgarten**: Ueber die Färbungsunterschiede zwischen Tuberkel- und Leprabacillen (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. I, 1887, Nr. 19, S. 573.)

    Derselbe: Tuberkel- und Leprabacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. II, 1887, Nr. 10, S. 291.)

    Derselbe: Unterscheidungsmerkmale des Bac. der Tuberkulose und der Lepra. (Monatsh. f. prakt. Derm., 1884, Bd. 3, Nr. 7, S. 193.)
11. **Beck**: Zur Frage der säurefesten Bacillen (Tuberkulose-Arb. aus d. Kais. Ges.-Amte, Hft. 3, S. 145.)

12. **Berger**: Vergleichende färberische Nachprüfungen der von Ziehl-Neelsen, Much und Gasis empfohlenen Färbemethoden für Tuberkelbacillen und einige Versuche über Umfärbungen bereits gefärbter Bacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., 1910, Bd. 53, Hft. 2, S. 174.)

13. **v. Betegh**; Neue differentialdiagnostische Färbemethode für Tuberkel-, Perlsucht- und andere säurefeste Bacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 47, 1908, Hft. 5, S. 654.)

14. **Bienstock**: Zur Frage der sogenannten Syphilis- und Tuberkelbacillenfärbung. (Fortschr. d. Med. 1886, Nr. 6, S. 193.)

15. **Bitter**: Ueber Syphilis- und Smegmabacillen nebst Bemerkungen über die färberischen Eigentümlichkeiten der Smegma- und Tuberkelbacillen. (Virchow-Arch. 1886, Bd. 106, Hft. 2, S. 209.)

16. **Brieger**: Ueber die diagnostische und therapeutische Bedeutung der Tuberkelbacillen und anderer Bakterien im Auswurf. (Berl. klin. Wchschr., Nr. 13.)

17. **Bunge und Trantenroth**: Smegma- und Tuberkelbacillen. (Fortschr. d. Med., Bd. 14, 1896, Nr. 23, S. 24.)

18. **Cazottes**: Étude sur la coloration et la décoloration des bacilles acido-résistants (Lyon 1904. Ref: Baumg. Jahresb. 1905, S. 566.)

19. **Courmont et Potet**: Les bacilles acido-résistants du beurre, du lait et de la nature comparés au bacille de Koch. (Arch. de méd. expér. Année 15, Nr. 1, p. 83. Ref: Baumg. Jahresb. 1903, S. 495.)

20. **Czaplewski**: Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum. (Ctbl. f. Bact. etc. 1890, Bd. 8, Nr. 22, S. 685.)
Derselbe: Zur Kenntnis der Smegmabacillen. (Münchn. med. Wchschr. 1897, Nr. 43, S. 1192.)

21. **Dammann und Müssemeier**: Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Tuberkulose des Menschen und der Tiere. (1905 Verlag von M. und H. Schaper, Hannover.)

22. **Dahms**: The Smegma Bacillus (Journal of the American med. Assoc. April 21 and 28. Ref: Baumg. Jahresb. 1900, S. 396.)

23. **Dietrich**: Säurefeste Bakterien in einer vereiterten Ovarialcyste. (Berl. klin. Wochenschr. 1899, Nr. 9, S. 189.)

24. **Dorset**: A new stain for Bacillus tuberculosis (Ref: Ctbl. f. Bact. etc., 1899, Bd. 26, Nr. 10, S. 309.)

25. **Le Douse**: Bemerkungen zu dem Artikel des Herrn M. Dorset: „A new stain for Bacillus tuberculosis (Ctbl. f. Bact. etc., 1900, Bd. 27, S. 616.)

26. **Eber**: Experimentelle Uebertragung der Tuberkulose vom Menschen auf das Rind etc. (Zeitschr. f. Tub. und Heilstw., Bd. X. Ref: 1906, S. 155, Orig.-Ref: Ctbl. f. Bact. etc., 1. Abt., 1906, Bd. 38, Nr. 15/16, S. 449, Berl. tierärztl. Wchschr. Nr. 28.)

27. **Ehrlich**: Beiträge zur Theorie der Bacillenfärbung. (Charité-Annalen, 1886.)

28. **Fischel**: Untersuchungen über die Morphologie und Biologie des Tuberkulose-Erregers. (Wien und Leipzig, 1893.)

29. **Fontes**: Untersuchungen über die chemische Natur der den Tuberkelbacillen eigenen Fett- und Wachsarten und über das Phänomen der Säureresistenz (Ctbl. f. Bact. etc., Abt. 1, Orig. 1909, Bd. 49, S. 317.)

30. **Forsell**: Eine verbesserte Methode zum Nachweis von Tuberkelbacillen im Harn. (Deutsche Zeitschr. f. Chirurgie, Bd. 66, S. 276.)

31. **Fränkel, A.**: Einige Bemerkungen über das Vorkommen von Smegmabacillen im Sputum. (Berl. klin. Wchr. 1898, Nr. 40, S. 880.)

32. **Fränkel, B.**: Differentialfärbung zwischen Tuberkel- und Smegmabacillen. (Berl. klin. Wchschr. 1884, Nr. 13, S. 194 u. 214.)

33. **Fränkel, C.**: Zur Kenntnis der Smegmabacillen (Ctbl. f. Bact. etc. Orig. Abt. I, Bd. 29, Nr. 1, S. 1.)

34. **Friedmann**: Der Schildkrötentuberkelbacillus, seine Züchtung, Biologie und Pathogenität (Ctbl. f. Bact. etc., 1903, Bd. 34, Nr. 7 und 8, S. 647.)

35. **Gasis**: Ueber eine neue Reaktion der Tuberkelbacillen und eine darauf begründete differentialdiagnostische Färbemethode. (Ctbl. f. Bact. etc., Orig. Bd. 50, Hft. 1, 1909, S. 111.)

36. **De Giacomi**: Neue Färbungsmethode der Syphilisbacillen (Correspondenzblatt der Schweizer Aerzte, 1885, Nr. 12.)

37. **Gottstein**: Bemerkungen über das Färbungsverhalten der Tuberkelbacillen. (Deutsche med. Wchschr. 1886, Nr. 42, S. 737.)

Derselbe: Beeinflussung des Färbungsverhaltens von Mikroorganismen durch Fette. (Fortschr. d. Med. 1886, Orig. Nr. 8, S. 252.)

Derselbe: Zusatz zum Referat über de Giacomi: „Färbung der Syphilisbacillen". (Fortschr. d. Med. 1885, Nr. 16, S. 545.)

38. **Grethe**: Smegma- und Tuberkelbacillen. (Fortschr. d. Med. 1896, Nr. 9, S. 329.)

39. **Grünbaum**: Note on the Smegmabacillus, its diagnostic importance, its culturation. (Lancet 1897, vol. 1, p. 98.)

40. **Hansen**: Die Aetiologie der Lepra. (Virchow-Festschrift Bd. 3. Ref: Baumg. Jahresb. 1892, S. 269.)

41. **Hauser**: Note sur la coloration du bacille de la tuberculose. (Comptes rendus de la Soc. de Biol., S. 1003. Ref: Baumg. Jahresb. 1898, S. 471.)

42. **Herman**: Sur la coloration du bacille tuberculeux. (Annal. de Institut Pasteur. 1908, Nr. 1, S. 92.)

43. **Herr**: Ein Beitrag zur Verbreitung der säurefesten Bakterien. (Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskr., Bd. 38, Hft. 1, S. 201.)

44. **Honsell**: Differentialfärbung zwischen Tuberkelbacillen und den Bacillen des Smegmas. (Arbeiten aus d. path. Institut Tübingen, v. Baumgarten herausg. 1896, Bd. 2, Hft. 2, S. 317.)

45. **Hormann und Morgenroth**: Ueber Bakterienbefunde in der Butter. (Hyg. Rundsch. Bd. 8, Nr. 5, S. 217.)

46. **De Jong**: Die Steigerung der Virulenz des Menschen- zu der des Rindertuberkelbacillus. (Ctbl. f. Bact., etc. Abt. I, Bd. 38, S. 146, 254.)

47. **Karlinski**: Zur Kenntnis der säurefesten Bakterien. (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 29, 1901, S. 521.)

48. **Karlinski**: Zur Frage der Uebertragung der menschlichen Tuberkulose auf das Rindvieh. (Ref: Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 31, 1902, S. 76.)

49. **Kaufmann**: Ein einfaches Verfahren zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Auswurf (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 12, 1892, S. 143.)

50. **Kayser**: Beitrag zur Differentialdiagnose zwischen den echten Tuberkelbacillen und den beiden säurefesten Bacillen: Grasbacillus Timothee-Görbersdorf und Butterbacillus Rabinowitsch. (Diss. Rostock 1902. Ref: Baumg. Jahresb. 1903, S. 392.)

51. **Klein**: Zur Kenntnis der Verbreitung des Bac. tub. und pseudotub. in der Milch, sowie der Biologie des Bac. tub. (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 28, S. 111.)

52. **Klemperer**: Ueber die Beziehung der säurefesten Saprophyten zu den Tuberkelbacillen. (Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 48, S. 250.)

Derselbe: Ueber Syphilis- und Smegmabacillen. (Deutsche med. Wchschr. 1885, Nr. 47, S. 809.)

53. **Korn**: Zur Kenntnis der säurefesten Bakterien. (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 25, 1899, S. 532.)

54. **Král und Dubard**: Étude morph. et biol. sur le bac. tub. piscium. (Revue de la tuberculose, Tub. Congr. 1898.)

55. **Kühne**: Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., 1890, Bd. 8, S. 293.)

56. **Küster**: Ueber Kaltblütertuberkulose. (Münchn. med. Wchschr. 1905, S. 57.)

57. **Laabs**: Ueber tuberkelbacillenähnliche Stäbchen in verschiedenen Körpersekreten etc. (In.-Diss. Freiburg 1894.)

58. **Laser**: Ueber Reinkulturen der Smegmabacillen. (Münchn. med. Wchschr. Nr. 43, S. 1192.)

59. **Lesieur**: Nouveau procédé de coloration du bacille de la tuberculose de Koch. (Province méd., p. 611. Ref: Baumg. Jahresb. 1898, S. 472.)

60. **Lecriz**: Cornet, Tuberkulose I, S. 90.

61. **v. Leyden**: Ueber Smegma- und Tuberkelbacillen. (Deutsche med. Wchschr. Nr. 19, S. 121, Vereinsbeilage.)

62. **Lustgarten**: Die Syphilisbacillen. (Wiener med. Jahrbücher 1885, Hft. 1, S. 89.)

63. **Lübinoff**: Zur Technik der Färbung von Tuberkel- und Leprabacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., 1888, Bd. 3, S. 540.)

64. **Marmorek**: Beitrag zur Kenntnis der Kultur und Färbung der Tuberkelbacillen. (Zeitschr. f. Tub. und Heilst., Bd. 1, 1900, Hft. 6, S. 444.)

65. **Marzinowsky**: Ueber eine neue Methode der Differentialfärbung der Mikroorganismen der menschlichen und der Vogeltuberkulose, der Lepra- und der Smegmabacillen. (Medicinskoie obosrenie, November, p. 727. Ref: Baumg. Jahresb. 1898, S. 472.)

Derselbe: Ueber einige in den Krypten der Gaumenmandeln gefundene Bacillenarten. (Ctbl. f. Bact. etc., 1900, Bd. 28, S. 39.)

66. **Matterstock**: Ueber Bacillen bei Syphilis. (Mitteilungen aus d. med. Klinik der Universität Würzburg, Bd. 2, 1886. Ref: Baumg. Jahresb. 1886, S. 259.)

67. **Mironescu**: Ueber das Vorkommen von tuberkelbacillenähnlichen Bakterien in menschlichen Faeces. (Ztschr. f. Hygienie, 1901, Bd 37, S. 497.)

68. **Moeller, A.**: Ein neuer säure- und alkoholfester Bacillus aus der Tuberkelbacillengruppe, welcher echte Verzweigungsformen bildet. (Ctbl. f. Bact. etc., 1899, Bd. 25, S. 369.)

Derselbe: Die Beziehungen des Tuberkelbacillus zu den anderen säurefesten Bakterien etc. (Ctbl. f. Bact. etc, 1901, Bd. 30, S. 513.)

Derselbe: Mikroorganismen, welche den Tuberkelbacillen verwandt sind und bei Tieren eine miliare Tuberkelkrankheit hervorrufen. (Deutsche med. Wchschr. 1898, Nr. 24, S. 377.)

Derselbe: Ein Mikroorganismus, welcher sich morphologisch und tinktoriell wie der Tuberkelbacillus verhält. (Berl. tierärztl. Wchschr. 1898, S. 100.)

69. **Moeller, A.**: Blindschleichentuberkulose. (Hyg. Rundschau, 9. Jhrg. 1899, S. 1246.)

70. **Möller, A.**: Der Smegmabacillus. (Ctbl. f. Bact. etc. 1902, Bd. 31, S. 278.)

71. **Moeller, P.**: Beitrag zum Vorkommen von Pseudotuberkelbacillen bei Rindern. (Berlin. tierärztl. Wochschr. 1903, S. 156.)

72. **Müller**: Ueber Tuberkelbacillen- und Sporenfärbung und Anwendung von Kaliumpercarbonat und Wasserstoffsuperoxyd. (Ctbl. f. Bact. etc., Abt. 1, Bd. 29, 1901, S. 791.)

73. **Nastinkow et Pewsner**: Ueber die Färbung der Tuberkelbacillen in Sublimatlösungen von Anilinfarben. (Ref: Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 14, 1893, S. 816.)

74. **Neisser**: Ueber die tinktoriellen Verhältnisse der Leprabacillen. (Virchow-Arch., Bd. 84, S. 514.)

75. **Nencki und Podczaski**: Differentialdiagnose des Tuberkel- und des Smegmabacillus. (Ref: Ctbl. f. Bact. etc., 1902, Bd. 31, S. 90.)

76. **Neufeld**: Beitrag zur Kenntnis der Smegmabacillen. (Arch. f. Hygiene, 1900, Bd. 39, Hft. 2, S. 184.)

77. **Nocard**: Sur les relations qui existent entre la tuberculose humaine et aviaire. (Annales de l'Institut Pasteur 1898, S. 561. Ref: Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 24, S. 848.)

78. **Olschanetzky**: Ueber ein neues säure- und alkoholfestes Stäbchen. (Ctbl. f. Bact. etc., Band 32, Nr. 1, S. 16.)

79. **Pappenheim**: Befund von Smegmabacillen im menschlichen Lungenauswurf. (Berl. klin. Wchschr. 1898, Nr. 37, S. 809.)

80. **Petri**: Zum Nachweis der Tuberkelbacillen in Butter und Milch. (Arbeiten aus d. Kais. Ges.-Amt, 1898, Bd. 14, S. 1.)

81. **Peters**: Die Untersuchung des Auswurfs auf Tuberkelbacillen. (Leipzig 1886).

82. **Petterson**: Untersuchungen über säurefeste Bakterien. (Berl. klin. Wchschr., Nr. 26, S. 562.)

83. **Prior**: Berliner klin. Wchschr. 1883, S. 497.

84. **Rabinowitsch**: Zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen in der Marktbutter. (Zeitschr. f. Hygiene, 1897, Bd. 26, S. 90.)

Dieselbe: Befund von säurefesten, tuberkelbacillenähnlichen Bakterien bei Lungengangrän (Dtsch. med. Wchschr., 1900, Nr. 16, S. 257.)

85. **Reper**: Differentialfärbung für Smegma- und Tuberkelbacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 32, 1903, S. 295.)

86. **Rondelli und Buscalioni**: Ueber eine neue Färbungsmethode des Tuberkelbacillus. (Ctbl. f. Bact. etc., Abt. 1, Bd. 21, 1897, S. 70.)

87. **Rupprecht**: Ueber säurefeste Bacillen nach Beschreibung eines Falles von spontaner Froschtuberkulose. (In.-Diss. Freiburg 1904. Ref: Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 36, S. 589.)

88. **Schütz**: Untersuchung der säurefesten Pilze zur Förderung der Molkereiwirtschaft. (In.-Diss. Heidelberg 1902. Ref: Zeitschr. f. Tub. u. Heilst., Bd. III, S. 450.)

89. **De Simoni**: Bacilli similtubercolari nel secreto delle otiti medie purulente chroniche. (Rif. med. 1904, Nr. 18. Ref: Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 36, 1905, S. 65.)

90. **Tavel**: Zur Geschichte der Smegmabacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., Bd. 2, 1887, S. 673.)

91. **Tobler**: Beitrag zur Frage des Vorkommens von Tuberkelbacillen und anderen säurefesten Bacillen in der Marktbutter. (Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 36, Hft. 1, 1901, S. 120.)

92. **Voltolini**: Ueber ein besonderes Erkennungszeichen der Tuberkelbacillen. (Bresl. ärztl. Zeitschr. 1885, S. 173.)

93. **Weber**: Ueber die tuberkelbacillenähnlichen Stäbchen und die Bacillen des Smegmas. (Arbeiten aus d. Kais. Ges.-Amt, 1902, Bd. 19, Hft. 2, S. 251.)

94. **Weber und Tante**: Die Kaltblütertuberkulose. (Tuberkulose-Arbeiten aus d. Kais. Ges.-Amt, Hft. 3, S. 110.)

95. **Weichselbaum**: Wien. med. Wchschr. 1884, cit. nach Grethe[88]).

96. **Wesener**: Ueber das tinktorielle Verhalten der Lepra- und Tuberkelbacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., 1887, Bd. 1, S. 450.)

Derselbe: Zur Färbung der Lepra- und Tuberkelbacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., 1887, Bd. 2, S. 131.)

97. **Yamamoto**: Eine Silberimprägnationsmethode zur Unterscheidung von Lepra- und Tuberkelbacillen. (Ctbl. f. Bact. etc., Abt. 1, Bd. 47, 1908, Nr. 5, S. 570.)

98. **Ziehl**: Deutsche med. Wochenschr. 1883, S. 62 u. 247.

Lebenslauf.

Geboren am 24. Juli 1885 in Borna (Bez. Chemnitz), besuchte ich, Paul Otto Köhler, zunächst ein Jahr die Schule zu Borna, dann drei Jahre die mittlere V. Bezirksschule in Chemnitz. Ostern 1896 wurde ich in die Sexta des Königl. Gymnasiums zu Chemnitz aufgenommen, wo ich Ostern 1905 die Reifeprüfung bestand. Seit dieser Zeit widmete ich mich dem Studium der Veterinärmedizin an der Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Dresden, bestand im 4. Semester die naturwissenschaftliche Prüfung und erlangte im Februar 1909 die Approbation als Tierarzt. Von März 1909 bis Dezember 1909 war ich als wissenschaftlicher Hilfsarbeiter im Hygienischen Institut der Königl. Tierärztlichen Hochschule beschäftigt. Am 1. April 1910 bin ich als Einjährig-Freiwilliger in das Kgl. Sächs. Feldartillerieregiment Nr. 12 eingetreten.